



**HAL**  
open science

# Dissection des interactions moléculaires de la glutarédoxine S15 mitochondriale chez les plantes

Loïck Christ

► **To cite this version:**

Loïck Christ. Dissection des interactions moléculaires de la glutarédoxine S15 mitochondriale chez les plantes. Biologie végétale. Université de Lorraine, 2023. Français. NNT: 2023LORR0127 . tel-04473359

**HAL Id: tel-04473359**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-04473359>**

Submitted on 22 Feb 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES  
UNIVERSITAIRES**

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)  
*(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)*

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UMR 1136 Interactions Arbres-Microorganismes  
Equipe Réponse aux stress et régulation redox**

**Thèse**

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

Mention : « **Biologie et écologie des forêts et des agrosystèmes** »

par **Loïck CHRIST**

Sous la direction de **Nicolas ROUHIER & Jérémy COUTURIER**

**Dissection des interactions moléculaires de la  
glutarédoxine S15 mitochondriale chez les plantes**

**Soutenue le 28 juin 2023**

Présidente du jury :	Mme. Claire Remacle	PR, Université de Liège
Directeurs de thèse :	M. Nicolas Rouhier M. Jérémy Couturier	PR, Université de Lorraine, Nancy MCF, Université de Lorraine, Nancy
Rapporteurs :	Mme. Sandrine Ollagnier de Choudens M. Benoit d'Autréaux	DR, CNRS, CEA Grenoble CR, CNRS, I2BC, Paris-Saclay
Examineurs :	Mme. Claire Remacle M. Claude Didierjean	PR, Université de Liège MCF, Université de Lorraine, Nancy



---

# Remerciements

---

## Remerciements

Nous voilà arrivés à la fin d'un chapitre. Ces presque 4 années ont été pour moi synonymes de beaucoup de travail, mais surtout d'une évolution autant personnelle que professionnelle. Cela je le dois à l'ensemble des personnes que j'ai eues la chance de côtoyer au cours de cette période et je tiens sincèrement à tous vous remercier. Je n'ai malheureusement jamais été très doué à cet exercice, mais je vais faire de mon mieux.

Je tiens en premier lieu à remercier l'ensemble des membres du jury Claire Remacle, Sandrine Ollagnier de Choudens, Benoit d'Autréaux et Claude Didierjean pour avoir accepté d'évaluer mon travail à travers la lecture de ce manuscrit. En espérant qu'elle vous sera aussi agréable que cela puisse l'être.

Mes remerciements les plus chaleureux vont évidemment à mes directeurs de thèse Nicolas et Jérémy, tout d'abord pour m'avoir accordé leur confiance, mais également pour avoir su être présents et disponibles lorsque le besoin s'en est fait sentir et cela malgré le reste des tâches qui vous incombent. Jérémy, même si le fer n'est plus au centre de tes préoccupations tu as toujours su me prodiguer de précieux conseils tant sur l'aspect méthodologique que théorique. Ta capacité à trouver les mots pour dédramatiser une situation en période de stress a réellement été une bouffée d'air pure pendant cette thèse. Enfin, je crois que je serai toujours abasourdi par la rapidité et l'efficacité de tes corrections ! Je pense que je ne lis pas aussi vite que tu corriges ! Nicolas, les mots me manquent pour exprimer toute la gratitude que j'ai pour toi. Depuis mon arrivée au labo, il y a maintenant un peu plus de 5 ans, tu as toujours été un modèle pour moi à tous les niveaux, autant sur l'aspect scientifique qu'humain. Tu sais faire en sorte que l'on donne le meilleur de soi en étant exemplaire, mais également maintenir une ambiance familiale qui fait l'âme de ce laboratoire. Je tiens encore une fois à te remercier pour la confiance que tu m'as accordée en me recrutant pour ce projet. J'espère avoir été en partie à la hauteur de tes attentes. On dit d'un doctorant qu'arrivé à la fin de sa thèse, son expertise dans son sujet doit dépasser celle de ses encadrants, je pense que la barre était un peu trop haute pour moi.. Enfin, j'espère ne pas vous avoir donné trop de cheveux blancs à toujours tout faire à la dernière minute (ces remerciements ne dérogeant pas à la règle).

Bien entendu, cette ambiance de travail chaleureuse ne pourrait pas l'être sans chacun des membres de l'équipe ! Je tiens donc à remercier l'ensemble des personnes que j'ai pu côtoyer, plus ou moins longtemps, au cours de ces 4 années de thèse mais également lors de mes stages de master. Désolé par avance si j'oublie quelques noms.. Tout d'abord un énorme merci à Delph...ine ! Détermination, c'est ton deuxième prénom. 5 années de galères communes ce n'est pas rien, on en sort tous les deux un peu cabossés mais ce sont déjà de bons souvenirs. Je me rappellerai longtemps ce fameux échange avec Toto ! Merci à Kevin également, sans qui je n'aurais certainement même pas eu ma licence faute de stylo.. (It's Muffin Tiiiime !) À Damien, le normie excentrique, même si je n'ai pas toujours été le plus réceptif à ton humour le bureau aurait été déprimant sans toi. Merci également à Flavien le boss, pour les mêmes raisons mais aussi pour les précieux conseils et les coups de mains que tu prends toujours le temps de donner au milieu de tes 10 manips hebdomadaires. Milles merci à Mélanie, qui en plus de m'avoir formé, s'est efforcée de me faire sortir de ma coquille et de m'intégrer à l'équipe, je n'aurais pas pu rêver meilleur tutrice pour mon premier stage ! Ça manque de soirée Karaoké depuis ton départ.. To Anna, « Die erste Mutter von GRXS15 », your banana bread is legendary ! Jonathan l'infatigable, qui m'a entraîné dans un triathlon purification-reconstitution-caractérisation malgré son horreur de la biochimie. Zhichao, dont l'énergie débordante m'étonnera toujours ! Ta positivité, ton entrain et ta curiosité ont été de véritables

rayons de soleil (en plus tu fais un délicieux riz cantonnais) ! Jean-Pierre, au plaisir de me faire à nouveau ridiculiser au billard. Alexis, le cervalobéophile, promis je penserai à toi lors de mes futurs voyages ! Tiphaine, que j'ai ennuyée un nombre incalculable de fois pour mes analyses ! Et ce n'est pas terminé.. Promis je penserai au pâté en croûte à mon pot. Raphaël, le papa-parfait qui entraîne les enfants même en béquilles ! Hâte de goûter tes Gnocchis ! Sébastien et Benji, qui ont toujours une anecdote à raconter. Les plus distinguées étant racontées au moment d'allumer un barbecue bien sûr ! En parlant de barbecue, merci à Mélanie de nous accueillir aussi souvent que faire ce peut pour partager de délicieuses grillades ! À Julie, qui a su nous montrer que même après une pandémie mondiale il suffit d'un peu de motivation pour pouvoir vadrouiller à l'étranger ! Merci à Natacha, qui a su ramener un peu de calme dans le bureau en cette période de crise. Désolé de t'avoir entraînée dans l'enfer des mitochondries dès ton arrivée.. À Linda, sans qui je n'aurais potentiellement jamais réussi à faire germer d'*Arabido* convenablement ! À Mathieu, qui m'aura bien soutenu pendant mes 6 mois de cauchemar avec HCF101, et à Arthur qui a repris le bébé. Bon courage, en espérant pouvoir t'aider pendant les quelques mois qu'il me reste au labo. Tu es le nouveau maître de la boîte à gant maintenant ! Je compte sur toi pour passer le flambeau à Yanis. Esteban, l'éternel indécis, qui va peut-être finir par se lancer dans une thèse.. ! Alicia, sorry we didn't have time to do a reconstitution together.. La gentille Elodie, qui s'inquiétait de nous voir rester aussi longtemps qu'elle au labo. Marion, toujours souriante malgré la fatigue qui a parfois pu s'accumuler ! J'aurais bien aimé pouvoir en dire autant... Julien et Rodnay, les maîtres Pokémon du labo, je garderai la technique de la chaussette à l'esprit si jamais je m'y remets. Et non il n'y aura pas de référence à Lorenzo ! Jean-Michel, le grand patron d'ASIA ! Je me demande toujours si je vais recevoir un petit devis quand je viens t'embêter avec mes analyses d'ITC. Marie-Laure, qui a su se rendre indispensable dès son arrivée au labo ! Un grand merci également à Eric, Arnaud, Muriel, Nicolas V., Ben, Corinne, Sylvain, Laura, Yanis... Les mots me manquent et j'oublie certainement quelques personnes mais je tiens à tous vous remercier pour votre bienveillance de tous les jours qui fait qu'on ne peut pas rêver meilleur cadre de travail pour réaliser une thèse.

Le doctorat c'est savoir s'investir corps et âme dans son travail mais également savoir le concilier avec sa vie personnelle, un aspect que j'ai malheureusement délaissé de plus en plus au fur et à mesure du temps.. Pour cette raison je tiens à remercier mes parents, Serge et Nathalie, et toute ma famille qui ont été un support indéfectible non seulement pendant mon doctorat mais également pendant toute la durée de mes études. Je ne suis pas certain que vous auriez parié sur le fait que j'aie aussi loin ! En espérant que vous en soyez fiers.

Merci également à tous mes amis de lycée (Benjamin, Steven, Kevin, Mika, Yoann, Mathias, Charlène, P-A et tous les autres..) pour tous les trop rares moments passés en votre compagnie. On a du temps perdu à rattraper ! À mes « copains magic » (Loulou, Jean, Rodrigue, Emilien) que je vois chaque vendredi soir depuis presque un an maintenant, le temps file !

Enfin, je remercie du plus profond de mon cœur la personne qui me supporte chaque jour depuis plus de 2 ans maintenant.. Caroline, mon arc-en-ciel ! Je sais que ce n'est pas toujours facile entre mon caractère de cochon, la fatigue et le stress que l'on subit tous les deux.. mais tu arrives toujours à mettre de la couleur dans ma vie ! Tu es constamment à mes côtés même lorsque je travaille jusque pas d'heure. Je ne te serai jamais assez reconnaissant pour tout le soutien que tu m'as apporté depuis que l'on se connaît. Merci pour tout

---

# Table des matières

---



# Table des matières

<b>I. Introduction.....</b>	<b>6</b>
1. L'homéostasie du fer chez les plantes .....	6
1.1. Acquisition du fer .....	6
1.2. Transport du fer .....	7
1.3. Stockage et compartimentalisation du fer .....	8
2. L'homéostasie redox mitochondriale chez les plantes .....	10
2.1. Origine des espèces moléculaires réactives (EMR) .....	10
2.2. Modification post-traductionnelle (MPT) des protéines par les EMR .....	12
2.3. Systèmes enzymatiques d'élimination des EMR.....	15
2.4. Systèmes de réduction .....	17
3. La machinerie ISC d'assemblage des centres Fe-S mitochondriale.....	42
3.1. Formation de centre [2Fe-2S] sur les protéines d'échafaudages ISUs .....	74
3.2. Formation et transfert des centres [4Fe-4S] .....	76
4. Objectifs du projet .....	78
<b>II. Matériels et méthodes .....</b>	<b>83</b>
1. Clonage par PCR .....	83
1.1. Amplification de fragments d'ADN .....	83
1.2. Purification de fragment d'ADN sur gel .....	83
1.3. Digestion des fragments d'ADN et ligature au sein d'un plasmide .....	83
1.4. Transformation bactérienne par choc thermique .....	84
1.5. Vérification de l'insertion du fragment d'ADN d'intérêt et séquençage .....	84
2. Production hétérologue de protéines recombinantes chez <i>E. coli</i> et purification.....	85
2.1. Transformation des bactéries par électroporation .....	85
2.2. Production de protéines recombinantes.....	86
2.3. Lyse des cellules.....	87
2.4. Purification de protéines recombinantes non étiquetées.....	87
2.5. Purification de protéines recombinantes étiquetées.....	90
2.6. Quantification des protéines .....	90
3. Purification d'anticorps à partir de sérum immun .....	91
3.1. Fixation de l'antigène sur résine.....	91
3.2. Purification d'anticorps par affinité à l'antigène .....	91

4.	Méthodes électrophorétiques.....	91
4.1.	Electrophorèse sur gel d'agarose.....	91
4.2.	Electrophorèse sur gel polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices.....	92
4.3.	Western Blot.....	94
5.	Caractérisation de protéines Fe-S.....	95
5.1.	Reconstitution de centre Fe-S.....	95
5.2.	Dosage de fer.....	96
5.3.	Dosage de soufre.....	96
5.4.	Test de stabilité du centre Fe-S.....	97
5.5.	Formation d'hétérodimères GRXS15-BOLA.....	97
5.6.	Test de transfert de centre Fe-S.....	97
5.7.	Titration Isotherme Calorimétrique (ITC).....	98
6.	Isolement de mitochondries issues de feuilles et pontage <i>in cellulo</i> .....	99
6.1.	Culture de plants d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	99
6.2.	Enrichissement de mitochondries.....	100
6.3.	Purification des mitochondries grâce à des billes de streptavidine.....	100
6.4.	Pontage de complexes protéiques <i>in cellulo</i> .....	100
7.	Co-immunoprécipitation.....	101
7.1.	Fixation des anticorps sur des billes de protéines A.....	101
7.2.	Immunoprécipitation de l'antigène.....	101

### **III. Résultats et discussion ..... 104**

#### **Chapitre 1 : Interactions moléculaires de GRXS15 liant un centre Fe-S.. 104**

1.	Purification de GRXS15 monomérique.....	104
2.	Reconstitution chimique de GRXS15.....	106
3.	Analyse des hétérocomplexes formés avec les protéines BOLA1/4.....	110
3.1.	Analyses <i>in silico</i> .....	111
3.2.	Co-expression des protéines GRXS15-BOLA et purification.....	113
3.3.	Formation d'holo-complexes GRXS15-BOLA1/4 <i>in vitro</i> .....	117
3.4.	Formation de centre [4Fe-4S] sur la protéine NFU4.....	122

#### **Chapitre 2 : Caractérisation des propriétés redox de GRXS15 ..... 131**

**Chapitre 3 : Complémentation fonctionnelle du mutant de levure *grx5* ... 147**

1. Analyse des phénotypes de croissance ..... 151
2. Analyse de l'activité aconitase ..... 152
3. Impact sur la voie d'assimilation du fer ..... 154

**Chapitre 4 : Recherche de partenaires de GRXS15 ..... 156**

1. Isolement de mitochondries par la méthode IMTACT..... 156
2. Co-immunoprécipitation *in organello* ..... 157

**IV. Conclusions générales et perspectives..... 168**

**V. Annexes ..... 178**

**VI. Références ..... 188**

---

# Introduction

---

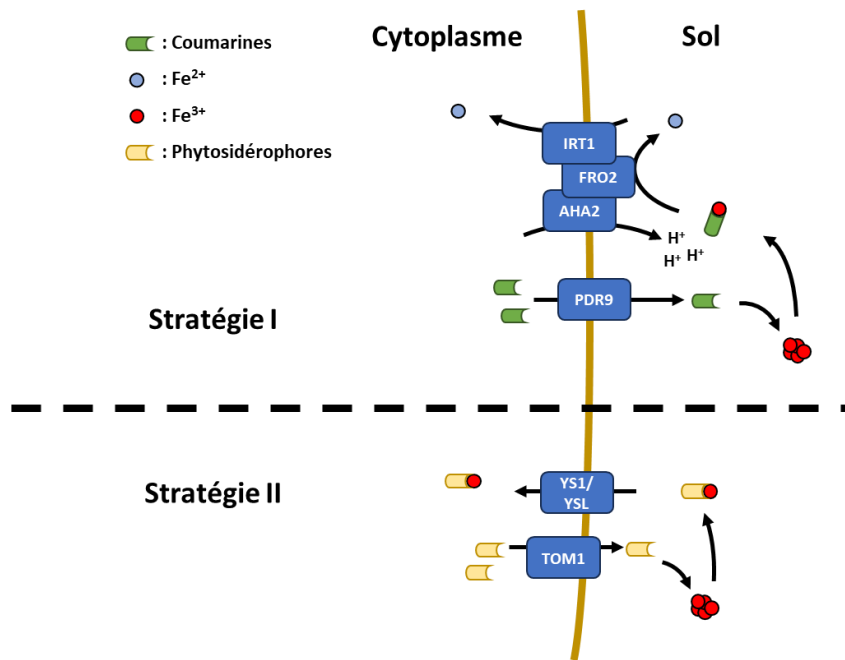
# I. Introduction

## 1. L'homéostasie du fer chez les plantes

### 1.1. Acquisition du fer

L'assimilation du fer chez les plantes dépend de deux stratégies complémentaires appelées stratégie réductrice (stratégie I) et stratégie chélatrice (stratégie II) (figure 1). La stratégie I a été mise en évidence chez les plantes dicotylédones et consiste en un processus en trois étapes : acidification-réduction-assimilation. Dans un premier temps, l'acidification du milieu rhizosphérique est médiée par des pompes à proton racinaires, dont l'isoforme majoritaire est AHA2 ( $H^+$  ATPase 2) (Santi et Schmidt, 2009). Cette acidification permet la solubilisation des oxydes de fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ), forme sous laquelle le fer est majoritairement retrouvé dans le sol. Le fer ferrique est ensuite mobilisé *via* l'excrétion de coumarines sous l'action du transporteur PDR9/ABCG37 (*Pleiotropic Drug Resistance 9/ATP-Binding Cassette G37*) (Fourcroy *et al.*, 2016; Robe *et al.*, 2021; Santi et Schmidt, 2009). Une fois accessible, le fer ferrique est réduit en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) par la protéine FRO2 (*Ferric Reduction Oxidase 2*) (Robinson *et al.*, 1999). Sous cette forme, le fer peut alors être assimilé grâce au transporteur IRT1 (*Iron-Regulated Transporter 1*) (Eide *et al.*, 1996). Ce processus est optimisé grâce à la formation d'un complexe tri-partite entre AHA2, FRO2 et IRT1, localisé au niveau de la membrane plasmique des cellules racinaires (Martín-Barranco *et al.*, 2020). Bien qu'IRT1 soit le transporteur de fer majoritaire, le transporteur de forte affinité NRAMP1 (*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1*) participe également à son absorption. De plus, un système de transport de faible affinité a également été mis en évidence, mais les acteurs moléculaires impliqués n'ont pas encore été identifiés (Castaings *et al.*, 2016). L'efficacité de cette stratégie dépend du type de sol sur lequel la plante croît. Un sol trop alcalin ou calcaire, ce qui représente environ 30 % des terres cultivables, limite la capacité de la plante à acidifier son milieu. La solubilisation du fer, sa réduction et *in fine* son assimilation s'en retrouvent alors impactées (Ohwaki et Sugahara, 1997; Romera *et al.*, 1997).

La stratégie II a été mise en évidence chez les plantes monocotylédones, et plus particulièrement les graminées (Nozoye *et al.*, 2011). Cette seconde stratégie se base sur l'excrétion de phytosidérophores de la famille des acides muginéiques (MA). Ces phytosidérophores sont synthétisés à partir de S-adénosylméthionine (SAM) sous l'action de 3 enzymes : nicotianamine synthase (NAS), nicotianamine aminotransférase (NAAT) et l'acide déoxymuginéique synthase (DMAS) (Bashir *et al.*, 2006; Higuchi *et al.*, 2001; Inoue *et al.*, 2009). Ils sont excrétés sous l'action du transporteur TOM1 (*Transporter Of Mugineic acid family phytosiderophores 1*) et permettent la chélation du fer ferrique ainsi que sa solubilisation (Kobayashi *et al.*, 2014; Nozoye *et al.*, 2011). Les complexes  $Fe^{3+}$ -MA ainsi formés sont ensuite transloqués jusque dans les cellules racinaires sous l'action des transporteurs des familles YS1 (*Yellow Stripe 1*) et YSL (*Yellow Stripe 1-like*) (Inoue *et al.*, 2009; Murata *et al.*, 2006).



**Figure 1. Représentation schématique du système d'acquisition du fer chez les plantes**

La stratégie I est employée par les plantes dicotylédones. Elle repose sur la solubilisation du fer ferrique *via* l'excrétion de protons par la pompe à proton racinaire AHA2 ( $H^+$  ATPase 2). Le fer ferrique est alors mobilisé grâce à la présence de coumarines, excrétées par le transporteur PDR9 (*Pleiotropic Drug Resistance 9*), puis réduit en fer ferreux sous l'action de la protéine FRO2 (*Ferric Reduction Oxidase 2*). Enfin le fer ferreux est internalisé grâce au transporteur IRT1 (*Iron-Regulated Transporter 1*).

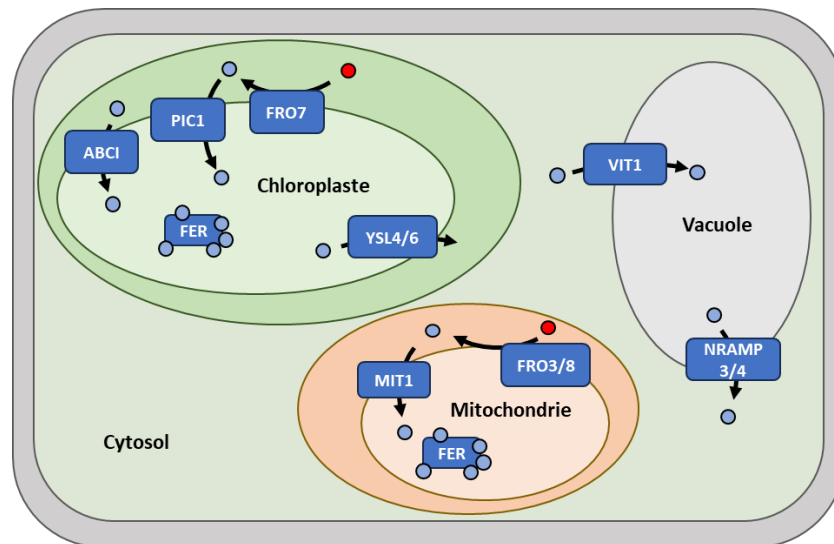
La stratégie II est spécifique de plantes monocotylédones et repose sur l'excrétion de phytosidérophores par le transporteur TOM1 (*Transporter Of Mugineic acid family phytosiderophores 1*) permettant la mobilisation du fer ferrique. Le complexe ainsi formé est ensuite absorbé par les transporteurs YS1 (*Yellow Stripe 1*) et YSL (*Yellow Stripe 1-like*).

## 1.2. Transport du fer

Une fois internalisé par la plante, la prise en charge et la distribution du fer doivent être finement régulées afin d'éviter tout effet toxique que le fer libre pourrait engendrer *via* la production d'espèces oxygénées réactives (EOR) par la réaction de Fenton et d'Haber-Weiss (Halliwell et Gutteridge, 1984). Ainsi, lors de son transport jusque dans le xylème puis jusqu'aux tissus foliaires, le fer est exclusivement présent sous forme de complexes. Dans un premier temps, il est pris en charge sous la forme d'un complexe  $Fe^{2+}$ -nicotianamine permettant son transport dans le symplasme (Inoue *et al.*, 2003). Le fer est ensuite transporté du symplasme vers l'apoplaste sous l'action des transporteurs YSL2 et ferroportine (FPN) (DiDonato *et al.*, 2004; Morrissey *et al.*, 2009). Il est alors majoritairement retrouvé sous forme de complexe  $Fe^{3+}$ -citrate dans le xylème (Rellán-Álvarez *et al.*, 2010) laissant penser que le fer serait oxydé suite à son chargement dans l'apoplaste. La translocation du fer du symplasme vers le xylème ainsi que l'influx de citrate nécessaire pour la chélation du fer sont médiés par les transporteurs FRD3 (*Ferric Reductase Defective 3*) et FPN (Durrett *et al.*, 2007; Morrissey *et al.*, 2009). Après avoir atteint les parties aériennes, le fer est à nouveau pris en charge par YSL2 afin d'être acheminé jusqu'aux cellules foliaires puis réduit par FRO6 avant d'être incorporé dans le cytosol (DiDonato *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2011).

### 1.3. Stockage et compartimentalisation du fer

Les chloroplastes représentent un puit de fer important dans les cellules des organismes photosynthétiques, puisqu'ils pourraient contenir jusqu'à 80-90 % du fer total présent (Terry et Abadia, 1986). Cela s'expliquerait notamment par le fait que la chaîne de transport d'électrons photosynthétique nécessite l'incorporation de 22 atomes de fer au sein des complexes photosynthétiques (Yruela, 2013). Afin d'être acheminé jusqu'au chloroplaste, le fer serait dans un premier temps réduit par FRO7. En effet, la mutation du gène *FRO7* provoque une diminution de l'activité photosynthétique en lien avec un défaut de maturation du cytochrome *b6f* (Jeong *et al.*, 2008). Le transporteur principal permettant l'approvisionnement du chloroplaste en fer est vraisemblablement la perméase chloroplastique 1 (PIC1) localisée au niveau de la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste (Duy *et al.*, 2007). D'autres transporteurs sont également suggérés comme pouvant être impliqués dans l'import de fer vers le chloroplaste, notamment ABCI10, ABCI11/NAP14 et ABCI12 (*ATP-Binding Cassette protein 10/11/12, Non-intrinsic ABC Protein 14*). Cette hypothèse est basée sur le phénotype des mutants *abci10* et *abci11* présentant un retard du développement chloroplastique ainsi qu'une diminution de la transcription de *PIC1* et *FRO7* (Voith von Voithenberg *et al.*, 2019). Les protéines ABCI10 et ABCI12 interagissent et co-localisent au niveau de la membrane interne du chloroplaste et pourraient donc y former un complexe (Voith von Voithenberg *et al.*, 2019). A l'heure actuelle, aucune évidence n'a cependant été rapportée concernant la direction (*ie* import/export) du transport de fer par ces transporteurs. Enfin un dernier transporteur, le facteur de résistance multiple (MAR1) est suggéré comme étant à la fois impliqué dans le transport de fer ainsi que dans sa chélation permettant ainsi d'éviter tout stress oxydant lors de l'import de fer dans le chloroplaste (Conte *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010). Une fois dans le chloroplaste, le fer est stocké grâce à des protéines dédiées appelées ferritines. Ces protéines forment des oligomères comportant 24 sous-unités et peuvent ainsi contenir jusqu'à 1000 atomes de  $Fe^{3+}$  associés à du phosphate (Briat *et al.*, 2010; Lönnnerdal, 2009). Le génome d'*A. thaliana* contient 4 gènes codant des ferritines (FER1-4) prédites comme étant chloroplastiques (Petit *et al.*, 2001). Ces protéines sont effectivement présentes dans le chloroplaste (Roschztardt *et al.*, 2013), et FER4 est également retrouvée dans la mitochondrie (Tarantino *et al.*, 2010; Zancani *et al.*, 2004). Bien qu'elles permettent un stockage efficace du fer, le chloroplaste ne le suraccumule pas dans des conditions physiologiques. Un contenu chloroplastique en fer suffisant induit une régulation négative du système d'import du fer (Solti *et al.*, 2012). En parallèle, un système d'export est également nécessaire afin d'éviter toute suraccumulation mais également afin de recycler le fer lors de la sénescence, phénomène accentué lors de carence et lors de la formation des graines (Maillard *et al.*, 2015; Pottier *et al.*, 2018). Cet export impliquerait les protéines YSL4 et YSL6 dont l'absence engendre une accumulation de fer dans le chloroplaste et une induction des gènes codant les ferritines (Divol *et al.*, 2013).



**Figure 2. Représentation schématique du système de transport intracellulaire du fer chez les plantes**

Le fer ferrique présent dans l'espace intermembranaire chloroplastique ou mitochondrial est réduit par les protéines FRO (*ferric reductase oxidase*) avant de traverser la membrane interne chloroplastique grâce aux transporteurs ABCI (*ATP-Binding Cassette protein*) et la perméase chloroplastique 1 (PIC1) ou la membrane interne mitochondriale grâce au transporteur de fer mitochondrial (MIT1). Une fois dans le stroma, le fer ferreux est stocké grâce aux ferritines (FER). Le fer peut également être exporté du chloroplaste sous l'action des transporteurs YSL (*Yellow Stripe 1-like*). L'import de fer dans la vacuole est permis par le transporteur de fer vacuolaire (VIT1), l'export est quant à lui permis par les transporteurs NRAMP3/4 (*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 3/4*). Le fer ferreux est représenté en bleu, le fer ferrique est représenté en rouge.

De même que pour le chloroplaste, la mitochondrie requiert un apport important en fer pour son fonctionnement. Le fer serait dans un premier temps réduit par les protéines FRO3/8, prédites comme étant mitochondriales (Jain *et al.*, 2014; Jeong et Connolly, 2009). L'apport de fer serait ensuite principalement médié par le transporteur de fer mitochondrial (MIT1) localisé au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, initialement identifié chez le riz (*Oryza sativa*) (Bashir *et al.*, 2011; Jain *et al.*, 2019). La même fonction a été confirmée chez *A. thaliana* qui possède deux gènes partiellement redondants, *MIT1* et *MIT2* (Vargas *et al.*, 2023). Il a été rapporté que le transporteur MAR1, initialement décrit comme exclusivement chloroplastique, est également impliqué dans l'import de fer au niveau de la mitochondrie (Kim *et al.*, 2021). Enfin, l'implication de Fe/Zn-CDF (*Cation Diffusion Facilitator*) dans l'import et/ou l'export de fer serait également à envisager, même si elle n'a pas encore été explorée à ce jour (Gustin *et al.*, 2011). De la même manière que dans le chloroplaste, le stockage de fer dans la mitochondrie serait assuré par une ferritine, FER4. En effet, il a été montré qu'une mutation du gène *FER4* d'*A. thaliana* entraîne une surexpression de FRO3 induisant une suraccumulation de fer concomitante à une augmentation de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la mitochondrie. L'absence de FER4 serait en partie contrebalancée par une surexpression de FER1 qui serait alors adressée à la mitochondrie (Tarantino *et al.*, 2010).

Bien que dans les cellules photosynthétiques le fer soit majoritairement nécessaire dans le chloroplaste et la mitochondrie, la vacuole serait également en partie impliquée dans son stockage,



notamment lors de la maturation des graines (Roschttardt *et al.*, 2009). L'accumulation du fer dans la vacuole est médiée par le transporteur de fer vacuolaire (VIT1) au niveau des graines en développement mais également par les transporteurs *Noduline-like1-4* dans les tissus racinaires (Gollhofer *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2006). L'absence de VIT1 entraîne une modification de la localisation du fer lors du développement embryonnaire, ainsi qu'un phénotype nain et chlorotique après germination sur sol alcalin (Kim *et al.*, 2006). La remobilisation du fer contenu dans la vacuole est régulée par les transporteurs NRAMP3/4 dont l'absence engendre également une hypersensibilité à la carence en fer (Lanquar *et al.*, 2005).

## 2. L'homéostasie redox mitochondriale chez les plantes

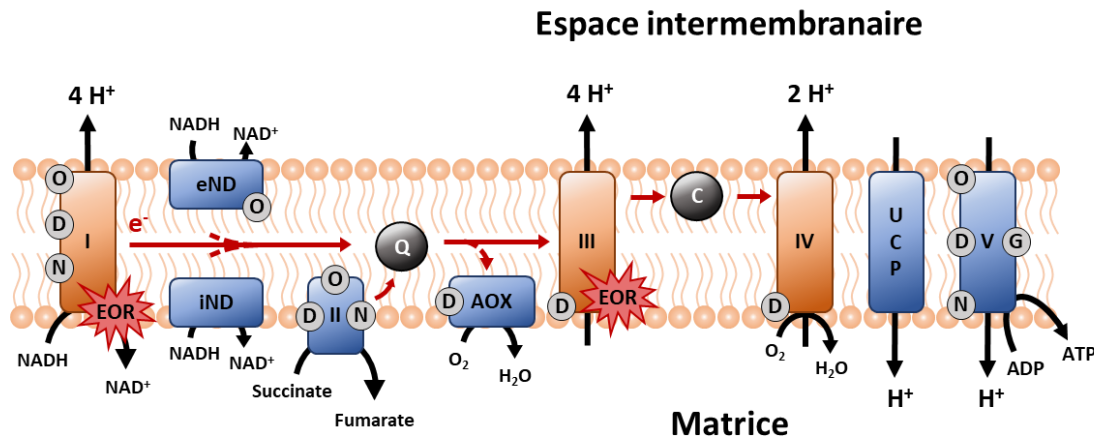
### 2.1. Origine des espèces moléculaires réactives (EMR)

#### 2.1.a. Espèces oxygénées réactives (EOR)

Les EOR peuvent être produites dans différents compartiments subcellulaires au cours de processus métaboliques tels que la photosynthèse, la respiration ou d'autres réactions chimiques. Les plus abondantes sont l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , le radical hydroxyle ( $\text{OH}\cdot$ ), l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) et l'ion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) (Tiwari *et al.*, 2017). Lorsque leur production est régulée et localisée, elles peuvent être à l'origine de cascade de signalisation permettant ainsi à la plante de répondre efficacement à un stress environnemental. En revanche, en cas de surproduction, les EOR peuvent endommager les protéines, les acides nucléiques ou encore les lipides membranaires et éventuellement entraîner la mort de la cellule (H. Huang *et al.*, 2019).

Dans la mitochondrie, la principale source d'EOR est la chaîne de transport d'électrons. Elle est composée de quatre complexes respiratoires (complexe I-NADH déshydrogénase ; complexe II-succinate déshydrogénase ; complexe III-cytochrome c réductase ; complexe IV-cytochrome c oxydase), quatre NAD(P)H déshydrogénases alternatives, de l'ubiquinone, une oxydase alternative (AOX), un cytochrome c (cyt c), l'ATP synthase (complexe V) et des protéines découplantes (UCP) (figure 1) (Schertl et Braun, 2014; Vercesi *et al.*, 2006). Les complexes respiratoires acceptent des électrons d'un donneur et les transmettent, par le biais de cofacteurs à flavine, d'hèmes ou de centres Fe-S, à un accepteur tout en transportant des protons depuis la matrice vers l'espace intermembranaire. Le pouvoir réducteur provient initialement du cycle des acides tricarboxyliques (TCA) permettant la formation de NADH et de succinate, respectivement substrats du complexe I et II. Le gradient de protons ainsi généré par les complexes respiratoires est utilisé par l'ATP synthase pour catalyser la conversion de l'ADP en ATP au sein de la matrice mitochondriale. Lors de ce processus, des électrons peuvent être dispersés à différentes étapes, notamment au niveau des complexes respiratoires I, II et III. Cette fuite est généralement causée par un ralentissement du flux d'électrons ou un transfert d'électrons inverse, en réponse à un stress, ce qui engendre une accumulation de pouvoir réducteur qui est alors transmis à

l'oxygène environnant (Larosa et Remacle, 2018). Il en résulte la formation d' $O_2^{\cdot-}$ . Des systèmes permettant d'éviter cette dispersion d'électrons ont cependant été mis en évidence (figure 3).



**Figure 3. Représentation schématique de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale**

Les complexes respiratoires participant à la mise en place du gradient de protons sont représentés en orange, les complexes respiratoires limitant la libération d'EOR sont représentés en bleu. Les flèches rouges représentent le flux d'électrons. Les modifications post-traductionnelles sont représentées par des ronds gris. Le détail de celles-ci est présenté dans l'annexe 1.

Abréviations utilisées : O : sulfénylation, D : pont disulfure, N : nitrosylation, G : glutathionylation, eND : NADH déshydrogénase externe, iND : NADH déshydrogénase interne, Q : ubiquinone, AOX : oxydase alternative, C : Cytochrome c, UCP : protéine découplante.

Les NAD(P)H déshydrogénases de type II se substituent aux complexes I et II en réduisant l'ubiquinone sans prendre part à l'échange de protons, limitant ainsi l'augmentation du potentiel membranaire (Rasmusson et Wallström, 2010). L'AOX permet quant à elle la réduction d'une molécule d' $O_2$  en  $H_2O$  via un apport d'électrons provenant de l'ubiquinone court-circuitant ainsi les complexes III et IV (Saha *et al.*, 2016). Dans la même logique, les UCP permettent l'influx de protons de l'espace intermembranaire vers la matrice lorsque la différence de potentiel électrique devient trop importante. En effet, un potentiel membranaire élevé entraîne une production accrue d'ions  $O_2^{\cdot-}$  au niveau des complexes I et III (Vercesi *et al.*, 2006).

### 2.1.b. Espèces nitrées réactives (ENR)

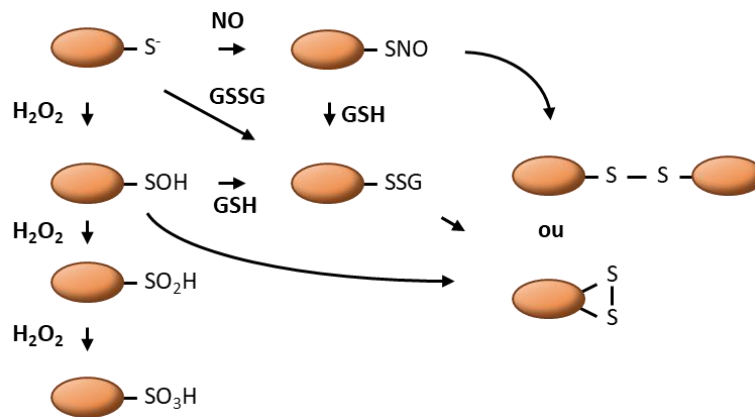
Chez les plantes, l'oxyde nitrique (NO) est produit dans différents compartiments subcellulaires (apoplaste, chloroplaste, cytosol et mitochondrie) par des processus non-enzymatiques et enzymatiques. De manière non enzymatique, il peut être généré à partir de dioxyde d'azote ( $NO_2$ ) en présence de caroténoïdes ainsi qu'à partir de nitrite ( $NO_2^-$ ) sous l'action des acides gibbérellique et abscissique dans l'apoplaste (Bethke *et al.*, 2004; Cooney *et al.*, 1994). La formation enzymatique de NO serait principalement due à l'activité de la nitrate réductase (NR) catalysant généralement la réduction du nitrate ( $NO_3^-$ ) en  $NO_2^-$  mais pouvant également réduire le  $NO_2^-$  en NO, lorsque celui-ci s'accumule dans le cytosol, en utilisant le NAD(P)H comme source d'électrons (Rockel *et al.*, 2002). La participation d'une molybdo-enzyme appelée NOFNiR (*NO-Forming Nitrite Reductase*) a récemment été démontrée

chez la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii*. Cette enzyme permet la réduction de  $\text{NO}_2^-$  en NO en présence de  $\text{NO}_3^-$  grâce à un apport d'électrons fournis par la NR (Chamizo-Ampudia *et al.*, 2016). Enfin, en condition anoxique, le  $\text{NO}_2^-$  pourrait être utilisé par la chaîne de transport d'électrons mitochondriale comme accepteur final générant ainsi du NO lorsque l' $\text{O}_2$  se raréfie (Gupta et Igamberdiev, 2011). Le NO ainsi formé peut réagir avec de l' $\text{O}_2^-$  et former du peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) extrêmement réactif mais également avec du  $\text{NO}_2$  pour former du trioxyde d'azote ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ).

Certaines ENR sont capables de réagir avec le glutathion réduit (GSH) pour former du glutathion nitrosylé (GSNO), qui est supposé être un réservoir de NO au sein de la cellule en raison de sa concentration, sa stabilité et sa capacité à franchir les membranes, permettant ainsi la transduction de signaux dans la cellule. Le NO peut également réagir avec le fer et notamment avec les centres Fe-S afin de former des CFDN (complexe ferrique di-nitrosylé) (Lehnert *et al.*, 2021). La formation de ces complexes aurait un effet bénéfique pour la cellule en limitant la formation d' $\text{ONOO}^-$ . Cela a notamment été démontré chez l'homme où la réaction du centre Fe-S lié par la glutarédoxine 2 mitochondriale (GLRX2) avec du NO au sein d'oligodendrocytes permet de limiter les dégâts engendrés par la formation d' $\text{ONOO}^-$  suite à différents traitements induisant un stress nitrosatif (Lepka *et al.*, 2017). Une fois formés, les CFDN peuvent être liés à des protéines ou des thiols de faibles poids moléculaires (*i.e.* GSH, cystéine). De plus les ligands peuvent être interchangeés sans déstabilisation du complexe (Lehnert *et al.*, 2021). L'abondance des CFDN dans les cellules végétales n'a, à ce jour, pas été expérimentalement déterminée. Cependant, dans des cellules animales, il a été rapporté qu'en réponse à un stress nitrosatif, l'abondance des CFDN était nettement supérieure à celle des nitrosothiols (un ordre de magnitude) (Hickok *et al.*, 2011). Les données expérimentales concernant l'étude des effets des CFDN dans un contexte biologique démontrent leur capacité à franchir les membranes, bien que les transporteurs impliqués ne soient pas à ce jour identifiés (Vanin, 2016). L'implication des CFDN dans la signalisation moléculaire en réponse à un stress nitrosatif est donc à envisager.

## 2.2. Modification post-traductionnelle (MPT) des protéines par les EMR

Les EMR jouent un rôle fondamental dans le métabolisme mitochondrial, modulant l'activité de protéines cibles impliquées dans divers processus physiologiques tels que le cycle TCA ou la chaîne de transport d'électrons (Møller *et al.*, 2020) (voir annexe 1 et 2). Cette régulation est réalisée *via* la modification de résidus spécifiques des protéines notamment les cystéines (figure 4), mais d'autres résidus peuvent être modifiés tels les méthionines, les lysines, les tyrosines et les tryptophanes (Møller *et al.*, 2020). Ces modifications sont généralement réversibles, permettant des mécanismes de régulation et d'adaptation rapides et ciblés du métabolisme cellulaire inenvisageables par le seul biais de régulation transcriptionnelle ou traductionnelle.



**Figure 4 : Représentation schématique du réseau des modifications post-traductionnelles des cystéines**

Le groupement thiolate ( $S^-$ ) d'une cystéine peut réagir avec du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et ainsi former un acide sulfénique (SOH). Des réactions successives conduisent à la formation d'acide sulfonique ( $SO_2H$ ) puis sulfonique ( $SO_3H$ ). Cette suroxydation peut cependant être évitée par la réaction d'un SOH avec du glutathion réduit (GSH), induisant alors la glutathionylation de la cystéine (SSG). La glutathionylation peut aussi résulter de la réaction entre un groupement  $S^-$  et du glutathion oxydé (GSSG) ou entre une cystéine nitrosylée (SNO), obtenue à partir d'une cystéine ayant préalablement réagi avec des dérivés de l'oxyde nitrique (NO), et du GSH. Les différentes formes d'oxydation décrites peuvent conduire à la formation de ponts disulfure intramoléculaire ou intermoléculaire.

La réactivité d'une cystéine, et par conséquent sa capacité à subir des modifications post-traductionnelles (MPT), dépend de différents paramètres tels que l'accessibilité et la réactivité de leur groupement thiol (-SH). Les cystéines étant des acides faibles, leur groupement -SH se retrouve en équilibre avec leur forme thiolate ( $S^-$ ), plus réactive. La proportion de chaque espèce à un pH donné est fonction de la constante de dissociation acide (pKa) de la fonction thiol de la cystéine étudiée. Celle d'une cystéine libre est d'environ 8,6 ce qui implique qu'à pH physiologique une cystéine libre est majoritairement sous forme protonée (Thurlkill *et al.*, 2006). En revanche au sein des protéines, notamment celles impliquées dans des réactions d'oxydo-réduction, le pKa des cystéines peut être significativement plus acide. Cela peut être dû à différents paramètres tels que le nombre de liaisons hydrogène avec le groupement thiolate ainsi que la position de la cystéine au sein de la structure protéique (Roos *et al.*, 2006, 2009). Il a longtemps été pensé que la proximité avec des acides aminés chargés positivement (*i.e.* arginine, histidine, lysine) puisse stabiliser le groupement thiolate d'une cystéine. Bien qu'ayant un impact dans certains cas, les études structurales et de mutagenèse dirigée sur des protéines appartenant à la superfamille des thiorédoxines (TRX) ont réfuté cette hypothèse (Billiet *et al.*, 2012; Foloppe et Nilsson, 2004, 2007; Grauschopf *et al.*, 1995; Hennecke *et al.*, 1997).

### 2.2.a. Oxydation

L'EOR la plus susceptible d'oxyder les protéines de par sa longévité ( $t_{1/2} = 1$  à 2,5 jours, en milieu aqueux), sa capacité à traverser les membranes et sa spécificité pour les molécules contenant du soufre (*i.e.* le groupement thiolate des cystéines) est l' $H_2O_2$ . La réaction entre l' $H_2O_2$  et un groupement thiol résulte en la formation d'un acide sulfénique (-SOH) et le relargage d'une molécule d'eau. Cette

modification est appelée sulfénylation. En l'absence de réduction et/ou présence d'un excès d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , l'acide sulfénique ainsi formé peut à nouveau réagir avec de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  menant à la formation d'acide sulfinique ( $-\text{SO}_2\text{H}$  ; sulfinylation) puis d'acide sulfonique ( $-\text{SO}_3\text{H}$  ; sulfonylation). Ces deux dernières formes d'oxydation sont généralement irréversibles, même si la réduction d'un acide sulfinique formé sur certaines peroxyrédoxines (PRX) peut être catalysée par une sulfirédoxine (Biteau *et al.*, 2003; Woo *et al.*, 2005). En ce qui concerne l'acide sulfénique, sa réduction est généralement rendue possible par l'attaque nucléophile de l'atome de soufre par un second groupement thiol à proximité. Si le second groupement thiol est porté par une cystéine de la même protéine on parle de formation de pont disulfure intramoléculaire, tandis que s'il est porté par une autre protéine on parle de formation de pont disulfure intermoléculaire. Enfin, si la formation d'un pont disulfure intermoléculaire est réalisée avec une molécule de glutathion, on parle alors de S-glutathionylation.

### 2.2.b. Glutathionylation

La glutathionylation intervient généralement suite à un premier évènement d'oxydation (sulfénylation ou nitrosylation) sur le groupement thiol de la protéine impliquée suivi par une attaque nucléophile de l'atome de soufre du groupement oxydé par une molécule de GSH. La glutathionylation empêche par conséquent toute réaction supplémentaire avec un agent oxydant protégeant ainsi le groupement thiol d'une suroxydation irréversible (sulfinylation, sulfonylation). Lors d'une forte génération d'EOR dans la mitochondrie, l'implication du GSH dans le cycle ascorbate – glutathion peut entraîner une oxydation du pool de GSH pouvant altérer son implication dans la régulation post-transcriptionnelle des protéines (Zsigmond *et al.*, 2011). La réduction du glutathion oxydé (GSSG) est permise grâce à l'action de la glutathion réductase (GR) mitochondriale, une flavoprotéine utilisant le NADPH comme source d'électrons (Edwards *et al.*, 1990). La glutathionylation pourrait aussi se produire *via* la réaction entre le groupement thiol d'une protéine et une molécule de GSSG. Une réaction directe, bien que décrite *in vitro*, devrait être limitée *in vivo* par le faible ratio GSSG/GSH au sein des compartiments cellulaires dits réducteurs. En effet, le potentiel redox du glutathion ( $E_{\text{GSH}}$ ) a pu être estimé dans différents compartiments cellulaires tels que le cytosol, la mitochondrie et le chloroplaste des plantes à l'aide de la sonde fluorescente roGFP<sub>2</sub>-GRX1. L'état d'oxydation de cette sonde peut être mesuré *in situ* grâce à une variation de ses propriétés fluorescentes en réponse à la formation ou la réduction d'un pont disulfure intramoléculaire, dont le potentiel redox est d'environ -280 mV, formé sur le domaine GFP. Le domaine glutarédoxine (GRX) permet quant à lui d'optimiser la réponse de la sonde aux variations du  $E_{\text{GSH}}$  intracellulaire (Albrecht *et al.*, 2014; Aller *et al.*, 2013). La sonde étant majoritairement réduite au sein de ces compartiments, ces résultats indiquent un  $E_{\text{GSH}}$  compris entre -300 et -320 mV (Aller *et al.*, 2013; Marty *et al.*, 2019). A titre de comparaison, le  $E_{\text{GSH}}$  dans le cytosol de levure sauvage est de -320 mV ce qui correspond à un ratio GSSG/GSH d'environ 1:10000 – 1:50000 (Calabrese *et al.*, 2017). La glutathionylation de protéines au sein de la mitochondrie pourrait cependant être catalysée par les GRX. Le GSNO pourrait aussi permettre la glutathionylation de certaines

protéines. Bien que cela ait été rapporté pour la protéine AtGRXS12 chloroplastique (Zaffagnini *et al.*, 2012b) ainsi que pour des GRX de classe I du peuplier (Couturier *et al.*, 2013), il semble néanmoins que le GSNO soit plutôt associé à des réactions de nitrosylation.

### 2.2.c. Nitrosylation

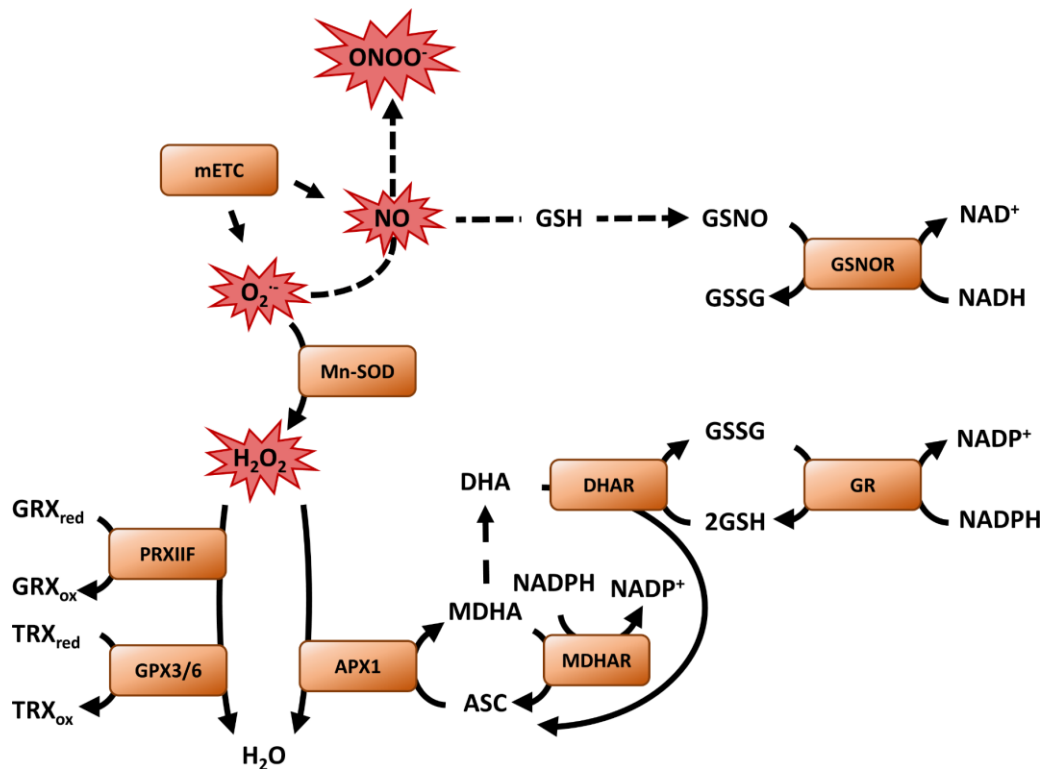
La nitrosylation de protéines peut être causée par différents mécanismes. Le premier consiste en la réaction d'un groupement thiolate avec un radical d'oxyde d'azote (NO<sup>•</sup>). Le second mécanisme pouvant induire la nitrosylation d'une protéine est la transnitrosylation qui fait intervenir une molécule déjà nitrosylée, telle que le GSNO ou une autre protéine nitrosylée par exemple. Le résidu thiolate d'une protéine peut ainsi effectuer une attaque nucléophile sur l'atome d'azote causant ainsi sa nitrosylation et conjointement, dans cet exemple, la libération d'une molécule de GSH. La concentration en GSNO au sein de la cellule est suggérée comme étant un facteur majeur affectant l'état redox des protéines *in vivo* (ie réduite ou nitrosylée), faisant du GSNO le médiateur majeur de la signalisation liée au NO (Broniowska *et al.*, 2013). Enfin, il a été rapporté que les CFDN sont également capables de moduler l'activité de protéines, vraisemblablement *via* la nitrosylation de résidus critiques pour leur activité (Lehnert *et al.*, 2021).

## 2.3. Systèmes enzymatiques d'élimination des EMR

Comme mentionné précédemment, les EOR peuvent endommager divers composants cellulaires en cas de surproduction. Des systèmes sont donc présents afin d'éviter leur accumulation (figure 5).

Dans la matrice mitochondriale, la toxicité de l'ion O<sub>2</sub><sup>-</sup> est contrée par l'action de superoxyde dismutases à Mn (MnSOD) permettant sa dismutation en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et en O<sub>2</sub> (Jackson *et al.*, 1978). Cette protéine est l'une des plus abondamment retrouvée dans la mitochondrie (Fuchs *et al.*, 2020). L'O<sub>2</sub><sup>-</sup> serait par conséquent presque instantanément transformé en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut ensuite être pris en charge par diverses peroxydases, les glutathion peroxydases (GPX), les PRX ou les ascorbate peroxydases (APX). Ces dernières sont réduites par l'ascorbate produisant ainsi du monodéshydroascorbate (MDHA) qui sera régénéré par le cycle ascorbate – glutathion (Jimenez *et al.*, 1997). Les monodéshydroascorbate réductases (MDHAR) régènèrent ensuite l'ascorbate à partir du MDHA en utilisant le NADPH comme source d'électrons. Le MDHA peut également s'oxyder spontanément en déshydroascorbate (DHA). La réduction du DHA fait alors intervenir les déshydroascorbate réductases (DHAR) utilisant le pouvoir réducteur du GSH (Jimenez *et al.*, 1997), produisant ainsi du GSSG qui est lui-même réduit par la GR mitochondriale utilisant le NADPH comme donneur d'électrons (Edwards *et al.*, 1990). Dans le cas des GPX, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est réduit en H<sub>2</sub>O de manière concomitante à la formation d'un acide sulfénique sur une cystéine catalytique située dans la région N-terminale de la protéine. Cet acide sulfénique est ensuite réduit grâce à une attaque nucléophile d'une seconde cystéine présente sur la protéine du côté C-terminal formant ainsi un pont disulfure intramoléculaire. Ce pont disulfure est ensuite réduit *via* l'action des TRX, ou de manière très peu

efficace par le glutathion ce qui a conduit à renommer les GPX en *GPX-like*. Ce système permettrait également l'élimination d'autres peroxydes (Navrot *et al.*, 2006). Chez *A. thaliana*, AtGPX6 est l'isoforme mitochondriale (Attacha *et al.*, 2017). Chez le riz, la GPX localisée dans la mitochondrie est appelée OsGPX3 et elle est principalement exprimée dans les racines où son absence provoque une forte accumulation d' $H_2O_2$  (Passaia *et al.*, 2013). Enfin, dans le cas des PRX, la réduction de l' $H_2O_2$  entraîne la formation d'un acide sulfénique sur la cystéine dite peroxydatique qui peut réagir avec une seconde cystéine formant ainsi un pont disulfure intramoléculeire (PRX Q, voire PRX II) ou intermoléculeire (2-Cys PRX). La régénération des PRX est généralement assurée par les TRX (Iglesias-Baena *et al.*, 2011; Pulido *et al.*, 2010). Chez les plantes, la PRX IIF mitochondriale permet, de la même manière que les GPX, la réduction de différents peroxydes. Par analogie avec la PRX IIE chloroplastique, elle serait préférentiellement régénérée par le système GRX/GSH (Gama *et al.*, 2008). Son absence, chez les lignées *PRX IIF*, est compensée par une augmentation des activités APX et GPX mitochondriales (Finkemeier *et al.*, 2005).

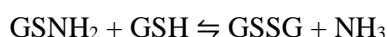
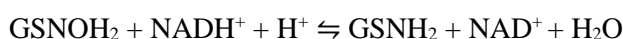


**Figure 5. Représentation schématique des systèmes de détoxication des EMR dans les mitochondries chez les plantes**

La chaîne de transport d'électrons mitochondriale (mETC) génère des ions superoxydes ( $O_2^{\bullet-}$ ) ou de l'oxyde nitrique (NO) pouvant réagir spontanément pour former du peroxyde nitrique ( $ONOO^{\bullet}$ ). Le NO peut également réagir spontanément avec du glutathion réduit (GSH) pour former du S-nitrosoglutathion (GSNO) pouvant être réduit par la S-nitrosoglutathion réductase (GSNOR). L' $O_2^{\bullet-}$  est quant à lui réduit en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par la superoxyde dismutase manganèse-dépendante (Mn-SOD). Celui-ci peut ensuite être réduit alternativement par la peroxyrédoxine IIF (PRXIIF), les glutathion peroxydases 3/6 (GPX3/6) ou l'ascorbate peroxydase 1 (APX1). Celles-ci sont respectivement régénérées par les glutarédoxines (GRX), les thioredoxines (TRX) ou le cycle ascorbate-glutathion. Les flèches discontinues représentent des réactions spontanées.

Abréviations utilisées : ASC : ascorbate, MDHA : monodéhydroascorbate, MDHAR : monodéhydroascorbate réductase, DHA : déshydroascorbate, DHAR : déshydroascorbate réductase, GSSG : glutathion oxydé, GR : glutathion réductase.

Comme discuté précédemment, le NO serait quant à lui majoritairement présent dans la cellule sous sa forme conjuguée au GSH, le GSNO, qui est capable de réagir avec la forme thiolate des cystéines. Par conséquent, sa concentration doit être finement régulée afin d'éviter toute sur-nitrosylation pouvant avoir un effet délétère. Ce rôle est assuré par la S-nitrosoglutathion réductase (GSNOR) qui catalyse la réduction du GSNO en GSSG et NH<sub>3</sub> en présence de NADH (Sakamoto *et al.*, 2002; Tichá *et al.*, 2017). La GSNOR est localisée dans la mitochondrie, le chloroplaste, le cytosol et le peroxyosome chez le pois (Barroso *et al.*, 2013).



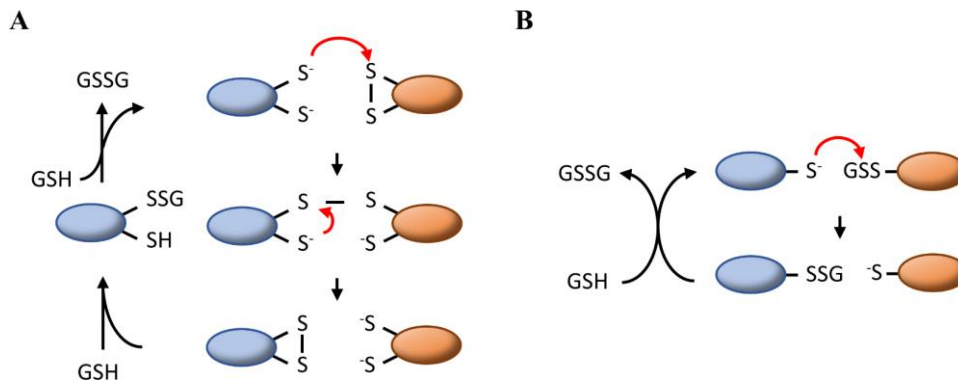
Une mutation du gène *GSNOR* d'*A. thaliana* provoque une augmentation de la quantité de GSNO et par conséquent des protéines nitrosylées (Feechan *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008). De plus, il a été montré que l'activité de protéines mitochondriales, notamment impliquées dans la chaîne de transport d'électrons, est modifiée en réponse à une modulation de l'expression de GSNOR (Fruingillo *et al.*, 2013). Cela pourrait donc suggérer un lien avec la formation d'EOR et d'ENR dans la mitochondrie (Lindermayr, 2018).

## 2.4. Systèmes de réduction

Les protéines ayant subi des MPT de type redox ont généralement besoin d'être réduites pour retrouver leurs activités. Cette régénération est médiée par des protéines de la superfamille des TRX permettant généralement la réduction de ponts disulfure. Certaines sont impliquées dans les réactions de dénitrosylation (Kneeshaw *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2019). Elles jouent également un rôle vital en tant que senseur de l'environnement redox et permettent ainsi la transduction de signaux cellulaires en modulant la conformation oxydative et par conséquent l'activité de protéines cibles (Møller *et al.*, 2020). Cette famille inclut principalement les TRX, les GRX, et les protéine disulfure isoméras (PDI). Elles sont caractérisées par une structure tri-dimensionnelle composée d'un feuillet  $\beta$  central constitué de 4 brins  $\beta$  et généralement entouré de 3 hélices  $\alpha$ , certains membres ayant 1 ou 2 hélices supplémentaires. Leur site actif contient une à deux cystéines conservées, qui se situent au sein d'un motif CxxC/S localisé à l'extrémité N-terminale de la première hélice  $\alpha$  (Martin, 1995). La cystéine présente du côté N-terminal, également appelée cystéine catalytique, est exposée et son pKa est compris entre des valeurs de 3,3 et 7,1 (Roos *et al.*, 2013). Une corrélation inverse a été observée pour les protéines de la superfamille des TRX présentes chez *E. coli*, incluant des TRX, des GRX et des DSB, entre le pKa de la cystéine catalytique et le potentiel redox du pont disulfure impliquant les deux cystéines du site actif (Roos *et al.*, 2013). Cela impliquerait une influence du pKa de cette cystéine sur la fonction des protéines *in fine* (i.e. oxydation ou réduction de leurs cibles).



Dans le cas des réductases, le pKa acide de la cystéine catalytique permet l'attaque nucléophile de l'anion thiolate sur un pont disulfure ou une autre forme d'oxydation, initiant ainsi le mécanisme de réduction. A partir de cette étape, deux mécanismes de réduction potentiels ont été mis en évidence. Le premier, appelé mécanisme dithiol, fait intervenir la seconde cystéine du site actif, également appelée cystéine de recyclage, qui va attaquer le pont disulfure entre les deux protéines menant à la formation d'un pont disulfure intramoléculaire sur la rédoxine et au relargage de la protéine cible réduite (figure 6A). Le second, appelé mécanisme monothiol, est plus spécifique des GRX. Il a longtemps été pensé que ce dernier permet spécifiquement la réduction de protéines glutathionylées, cependant une récente étude *in vivo* réalisée chez la levure suggère que ce mécanisme permettrait aussi la réduction de ponts disulfures protéiques (Zimmermann et al., 2020). Une attaque nucléophile de l'atome de soufre de la molécule de GSH par la cystéine catalytique de la GRX résulte en la libération de la protéine cible réduite et de la GRX glutathionylée. La GRX est ensuite réduite par une seconde molécule de GSH libérant ainsi une molécule de GSSG (figure 6B).



**Figure 6. Représentation schématique des mécanismes de réduction (A) dithiol et (B) monothiol**  
 Les réductases sont représentées en bleu et leurs substrats sont représentés en orange. Les différentes étapes réactionnelles sont détaillées dans le texte ci-dessus.

#### 2.4.a. Les thiorédoxines

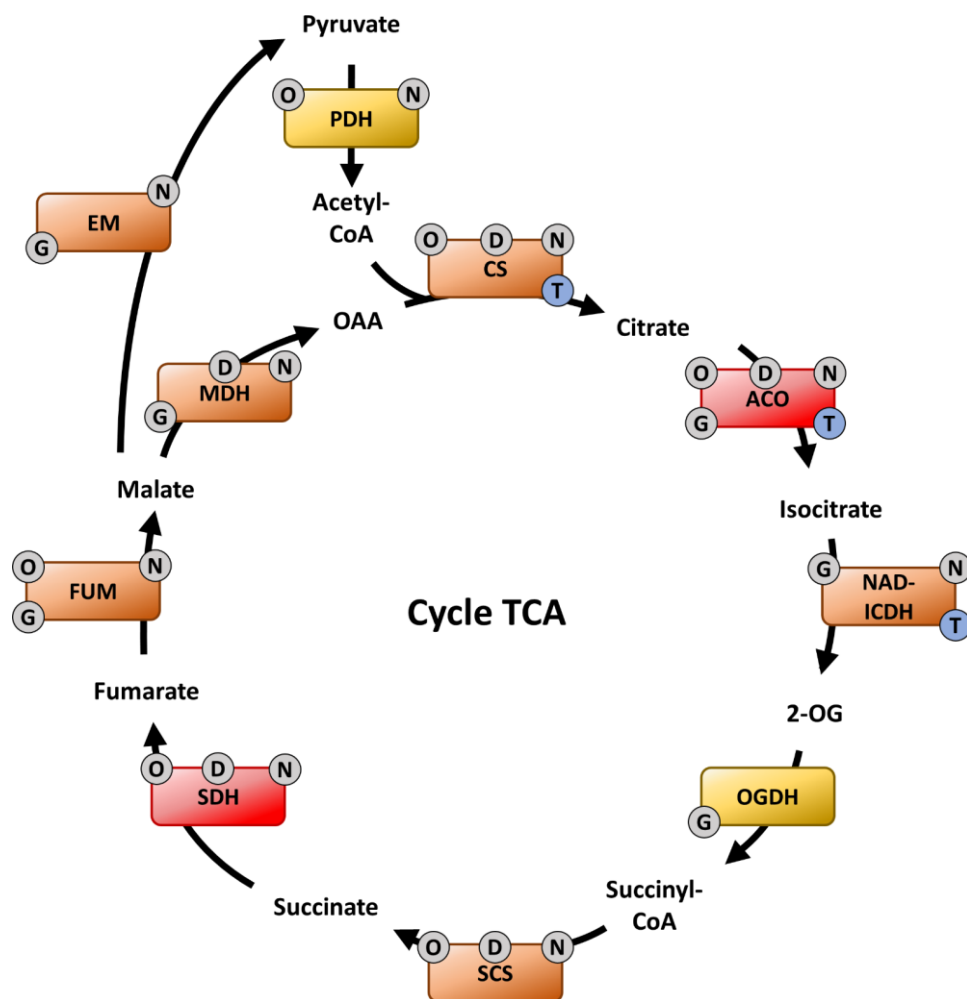
Chez *A. thaliana*, 21 gènes codant des TRX classiques ainsi que 19 codant des TRX atypiques ont été identifiés (Chibani *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 2012). Les TRX sont impliquées dans la réduction de ponts disulfure selon le mécanisme dithiol précédemment décrit. Leur réduction dépend de différentes protéines en fonction de leur localisation. Dans le chloroplaste, cette fonction est assurée par la ferrédoxine-thiorédoxine réductase (FTR), une protéine comportant un centre [4Fe-4S] permettant le transfert d'électrons reçus d'une ferrédoxine (FDX) afin de réduire une TRX oxydée (Chow *et al.*, 1995; Dai *et al.*, 2000). Dans le cytosol et la mitochondrie, les TRX sont réduites par une thiorédoxine réductase dépendante du NAD(P)H (NTRA et NTRB), les flavoprotéines tirant leur pouvoir réducteur du NADPH (Jacquot *et al.*, 1994; Laloi *et al.*, 2001). NTRA et NTRB ont été montrées comme ayant une double localisation mitochondriale et cytosolique, bien qu'il semblerait que NTRA soit l'isoforme majoritaire dans le cytosol et que NTRB soit majoritairement retrouvée dans la mitochondrie (Reichheld

*et al.*, 2005). Contrairement aux isoformes de mammifères, les NTR ne sont pas essentielles pour la viabilité chez les plantes (Reichheld *et al.*, 2007), laissant à penser que le système GRX/GSH/GR puisse se substituer aux NTR afin de réduire certaines TRX ou leurs cibles. Cette hypothèse est appuyée par la présence de TRX cytosoliques réduites dans un mutant *ntra/ntrb* (Reichheld *et al.*, 2007) et par l'observation que le système GRX/GSH/GR peut réduire certaines TRX cytosoliques de peuplier (Gelhaye *et al.*, 2003; Koh *et al.*, 2008; Reichheld *et al.*, 2007). L'état redox des TRX mitochondriales chez le mutant *ntra/ntrb* n'a cependant pas été analysé à ce jour. Il a été récemment montré que la spécificité d'une TRX vis-à-vis de sa réductase, mais également de leur substrat, est le fruit d'une complémentarité structurale permettant la reconnaissance des deux protéines et leur interaction *via* des liaisons essentiellement de nature électrostatique (Berndt *et al.*, 2015; Hossain *et al.*, 2021).

Les isoformes mitochondriales sont nommées TRXo1 et TRXo2 chez *A. thaliana* (Laloi *et al.*, 2001). Ces enzymes semblent impliquées dans la régulation de diverses voies métaboliques telles que le cycle TCA ou encore la photorespiration et être des acteurs importants de la mise en place du métabolisme mitochondriale lors de la germination (Nietzel *et al.*, 2020). Elles seraient également impliquées dans la détoxification des EOR notamment *via* leur interaction avec l'AOX et la PRX IIF. Comme expliqué précédemment, des conditions hyper-réductrices dans la mitochondrie peuvent nécessiter l'activation de l'AOX. Cette activation est médiée par la réduction d'un pont disulfure entre deux monomères qui est permise par les TRX, comme démontré *in vitro* avec la TRXh2 de peuplier, qui est mitochondriale, au contraire de la TRXh2 d'*A. thaliana* qui est retrouvée dans les microsomes (Gelhaye *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2021). L'addition de TRXo1, TRXh1 ou TRXh2, sous forme de protéine recombinante, à des mitochondries isolées de soja induit la réduction de l'AOX, montrant ainsi la capacité des TRX à activer l'AOX (Gelhaye *et al.*, 2004). La PRX IIF a été isolée dans des expériences de co-immunoprécipitation utilisant la TRXo1 de pois comme appât (Martí *et al.*, 2009). Cette interaction a été confirmée par des expériences de titrage calorimétrique isotherme en utilisant des protéines recombinantes (Barranco-Medina *et al.*, 2008). La TRXo1 serait donc vraisemblablement impliquée dans la réduction du pont disulfure et/ou de l'acide sulfénique formé sur la PRX IIF après réduction d'un peroxyde.

La majorité des enzymes du cycle TCA sont sensibles aux EMR et ont par conséquent été isolées au travers de diverses études de protéomiques visant à identifier les protéines affectées par la sulfénylation (J. Huang *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2020), la formation de ponts disulfure (J. Huang *et al.*, 2019), la nitrosylation (Fares *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2015; Lindermayr *et al.*, 2005; Romero-Puertas *et al.*, 2008) et la glutathionylation (Dixon *et al.*, 2005; Zaffagnini *et al.*, 2012a) (figure 7). Pour certaines de ces enzymes, il a été montré que ces modifications affectent leur activité. C'est par exemple le cas de la citrate synthase (CS) et de l'isocitrate déshydrogénase (IDH). L'activité de la CS est inhibée par la formation de divers ponts disulfure intramoléculaires dont la réduction serait dépendante des TRX (Schmidtman *et al.*, 2014). En ce qui concerne IDH, cette enzyme est active sous forme

hétérodimérique impliquant une sous-unité régulatrice, IDHr, et une sous-unité catalytique, IDHc. En conditions oxydantes, il a été montré qu'IDHr forme un trimère *via* la formation de ponts disulfure intermoléculaires réductibles par la TRXo1 (Yoshida et Hisabori, 2014). De plus, IDHr a été isolée dans des expériences de *pull-down* utilisant une version d'AtTRXo1 mutée pour la cystéine de recyclage comme appât (Yoshida *et al.*, 2013). Cette méthode, classiquement utilisée afin d'identifier les cibles potentielles des TRX, sera par la suite dénommée « *pull down redox* ». L'étude des mutants *trxo1* et *ntra ntrb* a permis de valider l'implication de la TRXo1 dans la régulation de l'IDH. Cependant, il semblerait au contraire que l'activité CS soit accentuée dans les feuilles du mutant *trxo1* (Daloso *et al.*, 2015). Des expériences de *pull-down redox* visant à identifier les cibles potentielles des TRX chez *C. reinhardtii* ont permis l'isolement d'un bon nombre de protéines impliquées dans le cycle TCA. Parmi elles, la sous-unité E1 du complexe pyruvate déshydrogénase (PDH), ACO1, SDH1, fumarate hydratase (FUM1), malate déshydrogénase (MDH) et enzyme malique (EM) (Pérez-Pérez *et al.*, 2017). La transposition de ces résultats aux plantes terrestres ainsi que la pertinence physiologique de ces interactions restent souvent à démontrer mais constituent tout de même une première piste permettant de mieux caractériser les systèmes impliqués dans la réduction des MPT identifiées sur ces enzymes.



**Figure 7. Représentation schématique du cycle des acides tricarboxyliques (TCA)**

Les enzymes représentées en rouge et en jaune sont respectivement dépendantes d'un centre Fe-S ou d'un cofacteur lipoate pour leur fonction. Les modifications post-traductionnelles sont représentées par des ronds gris. Le détail de celles-ci est présent dans l'annexe 2. Un rond bleu est présent lorsqu'une interaction avec une thioredoxine mitochondriale a été mise en évidence chez les plantes.

Abréviations utilisées : O : sulfénylation, D : pont disulfure, N : nitrosylation, G : glutathionylation, PDH : pyruvate déshydrogénase, CS : citrate synthase, ACO : aconitase, IDH : isocitrate déshydrogénase, OGDH : oxoglutarate déshydrogénase, SCS : succinate synthase, SDH (complexe II) : succinate déshydrogénase, FUM : fumarase, MDH : malate déshydrogénase, EM : enzyme malique.

Les TRX mitochondriales seraient également impliquées dans la régulation de la photorespiration *via* leur interaction avec le complexe glycine décarboxylase (GDC). Ce complexe est formé de 4 sous-unités (H, L, P et T) et permet, avec la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT), la conversion de glycine en sérine (Moore *et al.*, 1980). L'activité d'une de ces sous-unités, la GDC-T, serait régulée par la TRXo1 *via* la réduction d'un pont disulfure impliquant des cystéines permettant l'interaction avec la sous-unité GDC-H. Il a en effet été montré que l'absence de la TRXo1 chez *A. thaliana* provoque une suraccumulation de glycine et une diminution de la quantité de sérine (Reinholdt *et al.*, 2019). De plus, les sous-unités GDC-T et GDC-P ainsi que SHMT ont été identifiées comme cibles de la TRXo1 suite à des expériences de *pull down* redox utilisant les isoformes d'*A. thaliana*, de pois et de *C. reinhardtii* (Martí *et al.*, 2009; Pérez-Pérez *et al.*, 2017; Yoshida *et al.*, 2013).

Il est également intéressant de noter que plusieurs protéines impliquées dans la machinerie d'assemblage mitochondriale des centres Fe-S (ISC) ont été isolées comme cibles de la TRXo1 suite à des expériences de *pull down* redox utilisant l'isoforme d'*A. thaliana* comme appât. C'est le cas de la protéine d'échafaudage ISU1, de la cystéine désulfurase mitochondriale NFS1, de la glutarédoxine S15 (GRXS15), de la protéine de transfert de type A ISCA2 et des protéines NifU-like 4/5 (NFU4/5) (Yoshida *et al.*, 2013). Ces interactions sont probablement à mettre en lien avec la capacité de ces apo-protéines à former des ponts disulfure intra- ou intermoléculaires qu'il est nécessaire de réduire afin de permettre aux protéines de lier un centre Fe-S, tel que démontré pour les protéines NFU4 et NFU5 par exemple (Zannini *et al.*, 2018). Il est aussi possible que la capacité des TRX mitochondriales à lier un centre Fe-S puisse également expliquer leur interaction avec des protéines de la machinerie ISC (Zannini *et al.*, 2018). La pertinence de cette observation dans un contexte *in vivo* reste cependant à déterminer.

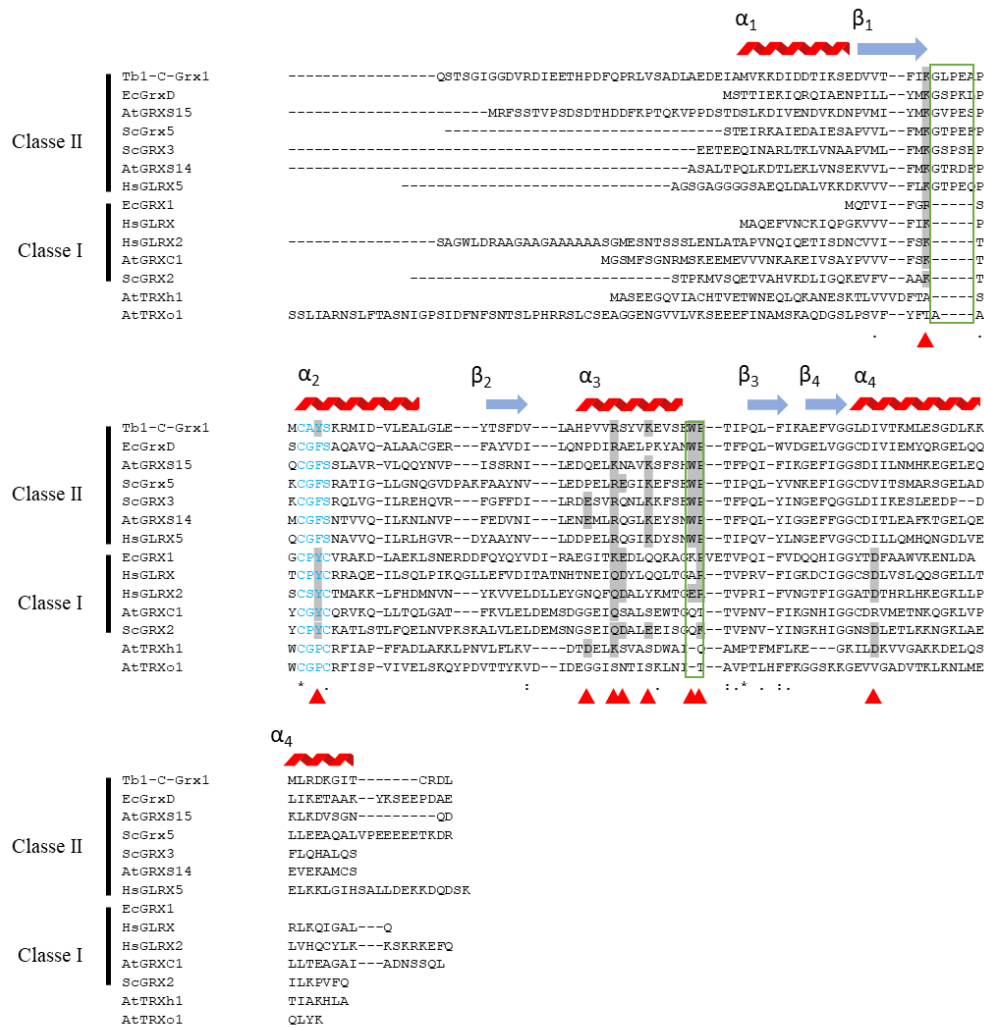
#### 2.4.b. Les glutarédoxines

Pour cette section, j'ai intégré un article de synthèse décrivant les GRX liant des centres Fe-S et pour lequel je suis co-auteur.

Les GRX provenant d'organismes photosynthétiques sont réparties en 6 classes sur la base de la séquence de leur site actif. Des isoformes des classes I à IV sont présentes chez les plantes terrestres et les isoformes des classe V et VI sont spécifiques des cyanobactéries (Couturier *et al.*, 2009). Les GRX sont toutes constituées d'au moins un domaine de 90 à 120 AA comportant différentes caractéristiques telles que la présence du site actif à l'extrémité N-terminale de la première hélice  $\alpha$ , la présence d'une proline 35-40 AA en aval et faisant face au site actif, suivie à environ 10 AA d'une paire de glycines (Couturier *et al.*, 2009). Le site actif des GRX de classe I est composé d'un motif CxxC/S, tandis que les isoformes de classe II présentent exclusivement un motif CGFS. Ces deux classes sont retrouvées chez la plupart des organismes vivants (Couturier *et al.*, 2009). Les spécificités structurales de ces deux classes ainsi que les différences fonctionnelles en découlant seront détaillées par la suite. Les GRX de la classe III possèdent quant à elles un site actif composé d'un motif CCxx. Cette classe est spécifique aux plantes terrestres (Couturier *et al.*, 2009). Contrairement aux GRX des trois premières classes qui sont constituées d'un unique domaine GRX, les isoformes appartenant à la classe IV, ou GRX-like, possèdent deux domaines supplémentaires de fonction inconnue situés en C-terminal. Cette classe est spécifiquement retrouvée chez les organismes eucaryotes, leur rôle reste inconnu (Couturier *et al.*, 2009).

Les GRX de classe I sont caractérisées par une activité oxydoréductase importante et sont généralement impliquées dans la régulation redox de protéines. Ces isoformes utilisent à la fois le mécanisme dithiol et le mécanisme monothiol précédemment décrits (figure 6) (Ukuwela *et al.*, 2018). Les GRX de classe II n'ont quant à elles généralement pas ou peu d'activité oxydoréductase. Cette différence a récemment été imputée à des divergences de séquence à plusieurs niveaux (figure 8). Les

différences les plus impactantes sont (i) une élongation de 5 AA de la boucle précédant le site actif et modifiant l'orientation de la molécule de GSH en interaction avec la GRX, (ii) la présence d'une Phe au sein du site actif (remplaçant la Tyr des GRX de classe I) et (iii) la présence d'un motif WP suivant l'hélice  $\alpha_3$  limitant la reconnaissance du substrat glutathionylé par la GRX (Liedgens et al., 2020). L'interconversion des isoformes de classe I et II par remplacement de ces motifs confirme leur implication dans les réactions d'oxydoréduction (Liedgens et al., 2020; Trnka et al., 2020). Il a également été montré que la présence d'une Pro au niveau du site actif empêche la fixation d'un centre Fe-S (Rouhier et al., 2007). Le remplacement de cette Pro par un autre AA, généralement une Ser ou une Gly, permet en effet la fixation d'un centre Fe-S par certaines glutarédoxines de classe I (Feng et al., 2006; Lillig et al., 2005; Rouhier et al., 2007). Ces dernières ne sont cependant pas capables de participer à leur transfert et il est donc pensé que le centre Fe-S serve de senseur redox permettant l'activation des GRX lors de conditions oxydantes. Le transfert du centre Fe-S serait en effet permis par la modification de l'orientation de la molécule de GSH causée par l'élongation de la boucle précédant le site actif chez les GRX de classe II (Trnka et al., 2020).



**Figure 8. Alignement des séquences protéiques de GRX de classe I et II**

Les séquences protéiques matures (*ie* dépourvues des séquences d'adressage) de GRX de classe I et II et d'autres membres de la superfamille des TRX ont été alignées *via* « MUSCLE ». Les structures secondaires sont représentées sur la base de la structure de Tb1-C-Grx1 (pdb : 2LTK). Les régions d'intérêt concernant l'interaction des GRX avec le GSH ont été mises en évidence. Les résidus prédits comme impactant sa reconnaissance ont été surlignés en gris et sont indiqués par des triangles rouges, les spécificités des GRX de classe II ont été entourées (en vert), le site actif des GRX a été représenté en bleu.

La GRXS15 présente dans les mitochondries de plantes est une isoforme de classe II, impliquée dans la machinerie ISC d'assemblage des centres Fe-S, au minimum par sa capacité à lier et transférer un centre Fe-S. Comme mentionné dans la revue ci-dessous, outre l'orthologue de cette isoforme, appelée GLRX5, la plupart des vertébrés possèdent une deuxième GRX mitochondriale, GLRX2. C'est une isoforme de classe I, liant également un centre Fe-S, mais dont les fonctions *in vivo* seraient majoritairement en lien avec son activité redox. Par conséquent, on peut supposer que les fonctions assurées par GLRX2 dans la protection de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (cytochrome c, complexe I), la réduction des PRX, de substrats glutathionylés ou encore dans la détoxication du NO

et de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Enoksson *et al.*, 2005; Hanschmann *et al.*, 2010; Johansson *et al.*, 2004; Lepka *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2010) puissent être assurées chez les plantes par les TRXo1/o2, GRXS15 ou un système de réduction jusqu'alors non identifié. Il est d'ailleurs également assez complexe d'établir des comparaisons ou de faire ressortir des similarités avec la levure *S. cerevisiae* puisque cet organisme possède aussi une deuxième isoforme exprimée dans les mitochondries (Grx2) mais celle-ci n'a pas la capacité de lier un centre Fe-S. Il est intéressant de noter que les mutants de levure pour *GRX5* et *GRX2* sont viables mais qu'un double mutant *grx5 grx2* ne l'est pas (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999).





# Glutaredoxins with iron-sulphur clusters in eukaryotes - Structure, function and impact on disease



Carsten Berndt<sup>a</sup>, Loïck Christ<sup>b</sup>, Nicolas Rouhier<sup>b</sup>, Ulrich Mühlenhoff<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Neurology, Medical Faculty, Heinrich-Heine University, Merowingerplatz1a, 40225 Düsseldorf, Germany

<sup>b</sup> Université de Lorraine, INRAE, IAM, F-54000 Nancy, France

<sup>c</sup> Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg, Robert-Koch Str. 6, 35032 Marburg, Germany

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Glutathione  
Iron metabolism  
Iron-sulphur cluster assembly  
Mitochondria  
Plastids  
Redox control

## ABSTRACT

Among the thioredoxin superfamily of proteins, the observation that numerous glutaredoxins bind iron-sulphur (Fe/S) clusters is one of the more recent and major developments concerning their functional properties. Glutaredoxins are present in most organisms. All members of the class II subfamily (including most monothiol glutaredoxins), but also some members of the class I (mostly dithiol glutaredoxins) and class III (land plant-specific monothiol or dithiol glutaredoxins) are Fe/S proteins. In glutaredoxins characterised so far, the [2Fe–2S] cluster is coordinated by two active-site cysteine residues and two molecules of non-covalently bound glutathione in homo-dimeric complexes bridged by the cluster. In contrast to dithiol glutaredoxins, monothiol glutaredoxins possess no or very little oxidoreductase activity, but have emerged as important players in cellular iron metabolism. In this review we summarise the recent developments of the most prominent Fe/S glutaredoxins in eukaryotes, the mitochondrial single domain monothiol glutaredoxin 5, the chloroplastic single domain monothiol glutaredoxin S14 and S16, the nuclear/cytosolic multi-domain monothiol glutaredoxin 3, and the mitochondrial/cytosolic dithiol glutaredoxin 2.

## 1. Introduction

Glutaredoxins (GRXs) were first described as glutathione (GSH)-dependent electron donors of ribonucleotide reductase in *Escherichia coli* in 1976 [1] and in mammals in 1979 [2]. In yeast and in plants, GRXs were identified in 1990 and 1994, respectively [3,4]. The members of this protein family belong to the thioredoxin (TRX) superfamily characterised at the structural level by the presence of a TRX-fold. It consists of a central four-stranded anti-parallel  $\beta$ -sheet surrounded by three  $\alpha$ -helices with a  $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$  topology, but one or two extra  $\alpha$ -helices are found in some representatives [5]. Oxidoreductases of the TRX superfamily such as GRXs are further characterised by their active site CxxC/S motif located on the loop between  $\beta$ 1 and  $\alpha$ 1 and by a totally conserved *cis*-proline which faces the active site. Using the active-site cysteines, GRXs reduce oxidised thiols, especially disulphides and glutathionylated thiols or catalyse protein glutathionylation. By this, GRXs are important regulators of redox signalling and involved in a variety of

cellular processes. Oxidised GRXs are primarily reduced by GSH which is itself maintained in reduced form by NADPH-dependent glutathione reductases (GRs). In 1999, GRXs harbouring a CGFS active site were identified [6] and referred to as monothiol GRXs and later as class II GRXs based on larger phylogenetic analysis. The formerly described dithiol GRXs belong to class I, which also contains GRXs with monothiol CxxS signature, hence justifying a change from a dithiol/monothiol into a class I/II classification system as proposed for plant isoforms [7]. In this review, the term monothiol GRXs uniquely refers to class II GRXs, unless explicitly stated. These two classes are found in almost every organism possessing GSH and GRX [8]. Noteworthy, at least four other GRX classes have been defined but their distribution is restricted to specific organisms, the class III GRXs are present in terrestrial plants, the class IV in eukaryotes and the classes V and VI in bacteria [7]. They differ notably at the level of their CxxC/S signature and by the presence of additional domains of unknown functions. Evidence for Fe/S cluster binding have been accumulated for GRX members of the first three

**Abbreviations:** Grx3 and Grx4 (*S. cerevisiae*), Grx3 (fungi), GRX3 (vertebrates), GRXS17 (plants), Glutaredoxin 3 (Cytosolic); Grx5 (fungi), GRX5 (vertebrates), GRXS15 (plants), Glutaredoxin 5 (mitochondria); GRX2, Glutaredoxin 2 (vertebrates); GRXS14 and GRXS16, plastidial monothiol glutaredoxins; Bol2 (fungi), BOLA2 (vertebrates), BOLA2 (plants), BolA proteins (cytosolic); Bol1 and Bol3 (fungi), BOLA1 and BOLA3 (vertebrates), BOLA1 (plants), BolA proteins (mitochondria); BOLA1 and BOLA4, plastidial BOLA proteins; CIA, cytosolic Fe/S cluster protein assembly; Fe-S, iron-sulphur; ISC, Fe/S cluster assembly; GSH, glutathione

\* Corresponding author at: Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg, Robert-Koch Str. 6, 35032 Marburg, Germany.

E-mail address: [muehlenh@staff.uni-marburg.de](mailto:muehlenh@staff.uni-marburg.de) (U. Mühlenhoff).

<https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2020.148317>

Received 24 July 2020; Received in revised form 7 September 2020; Accepted 18 September 2020

Available online 24 September 2020

0005-2728/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

classes with the first evidence provided for the human GRX2 in 2005 [9]. The crystal structure of this first described Fe/S GRX can be viewed in a museum as part of a permanent exhibition regarding bio-mineralisation in the Mineralien-Museum, Essen-Kupferdreh, Germany. The plant-specific class III GRXs will not be described here, because their capacity to bind an Fe/S cluster has been documented only in one study so far [10]. Regarding class I and class II GRXs, they are normally functionally distinct, the former functioning as oxidoreductases in apoforms, the latter playing key roles in iron homeostasis and Fe/S cluster biosynthesis [6,11]. In this review, we will focus on both class I and class II GRXs with Fe/S clusters in eukaryotes, their structural specificities and cellular functions in physiology and pathophysiology.

## 2. Fe/S cluster coordination in glutaredoxins

Most of the GRXs are able to coordinate a bridging [2Fe–2S] cluster in homo-dimers [11–14], but some class II GRXs coordinate additionally linear [3Fe–4S] and [4Fe–4S] clusters upon *in vitro* Fe/S cluster reconstitution experiments [15]. In 2005, the human GRX2 was characterised as the first Fe/S cluster binding class I GRX [9], the first class II/monothiol Fe/S-GRXs were identified in 2007 [16]. In contrast to any other Fe/S protein, GRXs use the cysteines of two non-covalently bound GSH molecules as ligands for cluster coordination (Fig. 1). The unusual use of non-protein ligands was confirmed by the different crystal structures of Fe/S GRXs. So far, structures of eukaryotic GRXs with a bound Fe/S cluster are available for human GRX2 and GRX5, poplar GRXC1, Arabidopsis GRXC5, and yeast Grx6 (PDB: 2HT9, 2WUL, 2E7P, 3RHC, and 5J3R, respectively). The two additional ligands consist of the N-terminal active site cysteine of each GRX monomer [16–20] (Fig. 1). In some organisms lacking GSH and/or having alternative low molecular weight thiols, such as trypanothione in trypanosomatids, these moieties can be used as alternative ligands [21].

GRXs need to bind glutathione for at least four purposes: 1) recognition of glutathionylated substrates and formation of a mixed disulphide, 2) reduction of this mixed disulphide by binding of a second GSH molecule, 3) coordination of the Fe/S cluster and 4) reaction with oxidised glutathione forms to catalyse glutathionylation reactions. The comparison of available structures of Fe/S GRXs and non-Fe/S GRXs revealed that all modes of interaction with GSH use the same GSH binding site based on five conserved motifs [11]. However, GSH binding to Fe/S GRXs displays more non-hydrophobic interactions than

GSH binding to non-Fe/S GRXs [11]. GSH is not only essential as ligand, but also shielding iron atoms against reactions with surrounding molecules [18]. The GRX-bound GSH is in constant exchange with GSH molecules in the environment [17,22]. Thereby, the stability of the Fe/S cluster depends on the GSH concentration in a first-order reaction [11].

Although all GRXs can bind GSH, not all GRXs can bind Fe/S clusters. Several structural features were identified to allow Fe/S cluster coordination. The consensus, best suited sequence to coordinate Fe/S clusters is the CGFS signature found in monothiol GRXs [12]. In class I/dithiol GRXs, one of the important features is the composition of the active site motif. The consensus sequence of the dithiol active site motif is YCPYC, whereas the active site motifs of the first described dithiol Fe/S GRXs, human GRX2 and poplar GRXC1, are SCSYC and YCGYC, respectively [9,19]. Exchange of prolines within the active sites between human GRXs 1 (TCPYC) and 2 [17] as well as poplar GRXs C1 and C4 (YCPYC) [10,19] demonstrated that a proline-free active site is mandatory for assembling an oxygen-stable Fe/S cluster in these proteins. The crystal structures of holo-dithiol GRXs revealed that the protein backbone in GRXs without a proline in the active site is more flexible and provides more space for the non-covalent GSH binding and the Fe/S cluster coordination [18,19]. Nevertheless, the presence of the proline does not hamper Fe/S cluster binding in all GRXs, as *Trypanosoma brucei* Grx1 harbouring the consensus CPYC motif was described as an Fe/S protein [23]. In the absence of structural and mutagenesis data, the question in this case is whether external non-protein thiols are required or whether the second cysteine may replace GSH. The observation that a CPxS active-site motif is fully compatible with Fe/S cluster binding by the yeast monothiol Grx4 corroborates the previous conclusion and suggests that a single N-terminal cysteine is sufficient [24].

Another interesting observation was made by comparing two plant-specific paralogs, GRXC5 and GRXS12, possessing WCSYC and WCSYS motifs respectively. Upon expression in *E. coli*, GRXC5, but not GRXS12, adopts the regular [2Fe–2S] cluster-bound homo-dimer [25]. Using site-directed mutagenesis on GRXS12, it was shown that the presence of the second cysteine is mandatory (although not participating in Fe/S cluster ligation) unless the Trp is replaced by a Tyr, thus becoming closer to other regular class I GRXs [25,26]. Hence, not only the +1 position (proline or not) relative to the ligating cysteine is important for Fe/S cluster ligation but also the –1 and +3 positions. As indicated

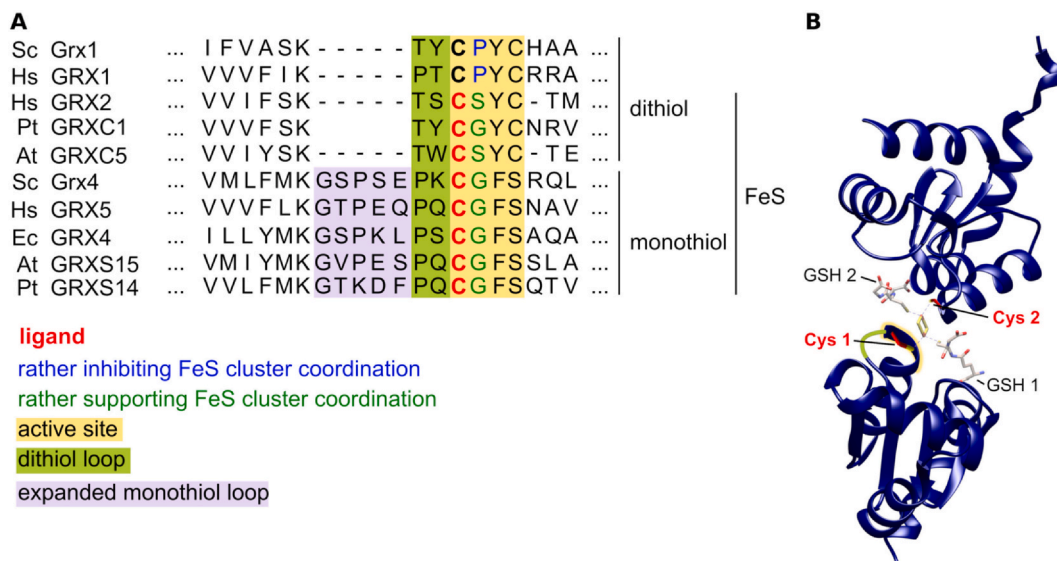
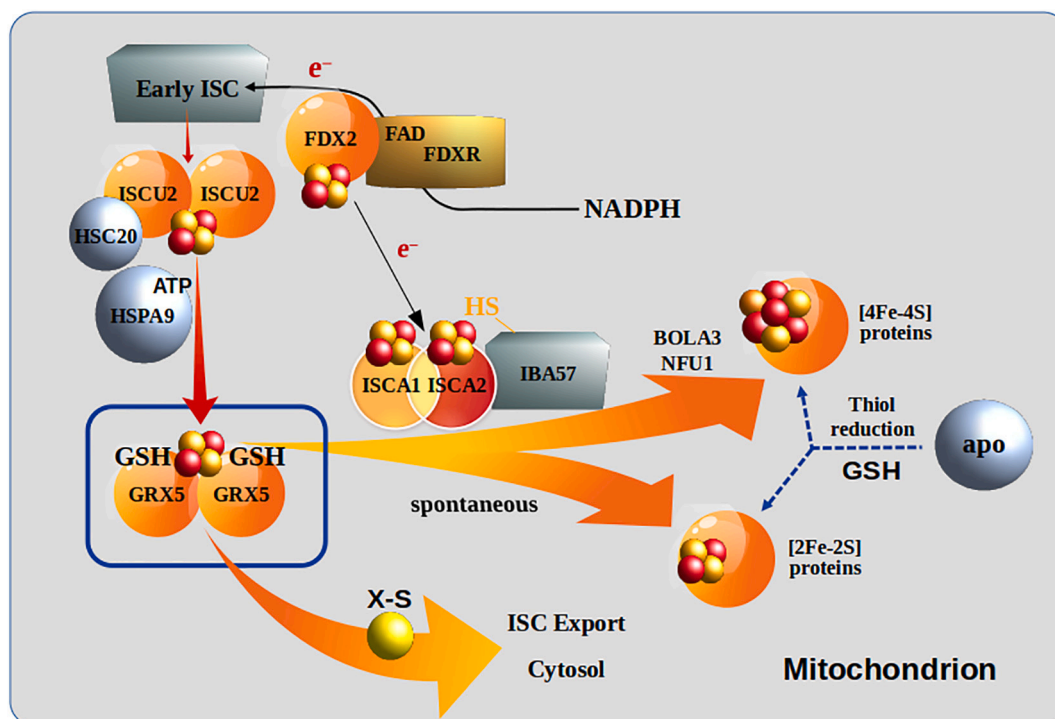


Fig. 1. Structural features affecting Fe/S cluster coordination in glutaredoxins.

A) Primary sequences of the active site area of different glutaredoxins. Amino acids important for Fe/S cluster coordination are highlighted as indicated. B) Crystal structure of human holo-GRX2 (PDB 2HT9). Position of the amino acids highlighted in A) are indicated using the same colour code as introduced in A).



**Fig. 2.** Monothiol glutaredoxin 5, central player connecting the early and late parts of the mitochondrial ISC assembly system.

The early part of the mitochondrial ISC assembly system (upper left) is dedicated to the *de novo* synthesis of [2Fe-2S] clusters on the central scaffold protein ISCU2 (Isu1 in *S. cerevisiae*) by the cysteine desulphurase complex NFS1-ISD11-ACP1, frataxin, and the mitochondrial electron transfer chain NADPH, ferredoxin reductase FDXR, and ferredoxin FDX2. Subsequent transfer of [2Fe-2S] clusters to GRX5 (Grx5 in *S. cerevisiae*; GRXS15 in *A. thaliana*) involves the mitochondrial Hsp70 chaperone HSPA9 and its dedicated J-type co-chaperone HSC20 (Ssq1 and Jac1 in *S. cerevisiae*). GRX5 serves as central Fe/S cluster donor for mitochondrial [2Fe-2S] and [4Fe-4S] target apo-proteins and affects the production or transport of X-S, the mitochondrial solute required for the formation of extra-mitochondrial Fe/S proteins. Fe/S cluster transfer and insertion into [2Fe-2S] target apo-proteins occur spontaneously, once their cysteine side chains are reduced by the cellular GSH/GRX or TRX systems. Dislocation and insertion into a [4Fe-4S] cluster and insertion into thiol-reduced mitochondrial apo-proteins further essentially involve the A-type ISC proteins ISCA1-ISCA2, the interacting ISC-factor IBA57, FDX2 and dedicated late-acting targeting factors. Electrons ( $e^-$ ) for reductive condensation of two [2Fe-2S] $^{2+}$  clusters into a [4Fe-4S] $^{2+}$  cluster on ISCA1-ISCA2 are provided by FDX2.

above, class I GRXs seem able to bind Fe/S clusters as long as the amino acid combination provides enough space for the non-covalent GSH binding and the Fe/S cluster coordination. Noteworthy, [S/T/G]CCx[C/S] active site signatures present in class III GRXs are also compatible with Fe/S cluster binding [10].

In addition to structural differences distinguishing between GRXs with and without Fe/S cofactors, there are also structural differences between dithiol and monothiol Fe/SGRXs. Recently, it was shown that an insertion of five amino acids forming a loop shortly before the active site in monothiol GRXs modifies binding of the GSH molecule, especially the orientation of the GSH thiol, and subsequently that of the Fe/S cluster [27,28] (Fig. 1). In line with the function of Fe/S cluster transfer (see below), the Fe/S cluster is less stable in class II GRXs. Introduction of the loop in dithiol GRXs led to inhibition of their thiol-oxidoreductase activity, whereas removal of the loop in monothiol GRXs conferred thiol-oxidoreductase activity to the variants [27,28]. *Vice versa*, GRX2 containing the loop was able to rescue haem formation in Grx5 deficient zebrafish, unlike GRX5 devoid of its five additional amino acids [27]. Thus, the elongated active-site loop functions as an off-switch for the thiol-oxidoreductase activity of (monothiol) GRXs [28].

### 3. Functions of single domain class II glutaredoxins as components of the Fe/S protein maturation systems in cell organelles

#### 3.1. Function of the mitochondrial glutaredoxin 5

Many eukaryotes possess the well-conserved mitochondrial

glutaredoxin 5 (Grx5 in fungi; GRX5 in human; GRXS15 in *Arabidopsis thaliana*). Similar single domain monothiol GRXs are found in almost all species in all kingdoms of life including bacteria and archaea. They display an almost invariant monothiol CGFS active-site sequence motif and a typical TRX-fold in its structural core. The Fe/S cluster-coordinating holo-protein forms a symmetrical homo-dimeric complex that accommodates the typical bridging [2Fe-2S] cluster coordinated by the thiol groups of the two active site cysteine residues and of two non-covalently bound GSH molecules as described above [29-31] (Fig. 1). Mitochondrial Grx5 was first described in baker's yeast *S. cerevisiae*. Its deletion is associated with a severe oxidative stress phenotype which initially pointed towards a role in mitochondrial oxidative stress defence [6]. Yet, subsequent analyses have shown that Grx5 plays a central highly conserved role in the mitochondrial iron-sulphur cluster assembly (ISC) system [32,33]. Defects in the mitochondrial ISC system are associated with a deregulated cellular iron homeostasis that is in many ways similar to that of iron-deprived cells [34]. Surplus iron accumulates to high levels within mitochondria causing mitochondrial iron overload and, as a consequence, iron-related oxidative damage. Thus, the massive oxidative damage seen upon deletion of GRX5 in yeast can be fully explained by its involvement in Fe/S protein biogenesis rather than by a direct role in protection against oxidative damage [35].

##### 3.1.1. *In vivo* role of glutaredoxin 5

In eukaryotes, the mitochondrial ISC system is essential for the maturation of all mitochondrial, cytosolic, nuclear and ER-associated Fe/S proteins. Only in plastids of plants and algae, Fe/S proteins are matured in a mitochondria-independent fashion by the plastid-specific

SUF (sulphur mobilisation) machinery (detailed description in [36–43]). For maturation of cytosolic and nuclear Fe/S proteins by the cytosolic iron-sulphur protein assembly (CIA) system, a sulphur-containing compound (X-S) exported by the mitochondrial ISC export machinery is required [44]. The importance of Fe/S protein biogenesis is underscored by severe and frequently lethal mitochondrial ‘Fe/S diseases’ with complex metabolic, haematological and neurological phenotypes caused by genetic mutations of the various ISC genes [40,45–49].

The assembly line of the mitochondrial ISC system operates in three consecutive steps involving 18 known proteins of mostly bacterial origin [36–41,50,51]. First, Fe/S clusters are formed *de novo* on a highly conserved scaffold protein (ISCU2 in human/Isu1 in yeast) (Fig. 2). This step is catalysed by the core ISC complex and results in the formation of a [2Fe–2S]-cluster likely on an ISCU2 dimer. Sulphur ligands are provided by the cysteine desulphurase complex NFS1-ISD11-ACP1 in form of a per-sulphide in a reaction stimulated by frataxin [52–56]. Fe/S cluster synthesis on ISCU2 further requires sulfane sulphur reduction by a mitochondrial [2Fe–2S] ferredoxin [33,57–59]. In the second step, the newly assembled [2Fe–2S] cluster on ISCU2 is transferred to recipient Fe/S proteins in a reaction requiring a specialised Hsp70 chaperone HSPA9, its J-type co-chaperone HSC20 (Ssq1 and Jac1 in yeast respectively), and mitochondrial GRX5 (Fig. 2) [60–63]. The formation of [4Fe–4S] clusters from the [2Fe–2S] clusters provided by the early parts of the ISC assembly line is the centre of the late part of the mitochondrial ISC system. This step essentially involves the A-type ISC proteins, ISCA1 and ISCA2, and IBA57 [64–68]. For some Fe/S proteins such as complex I and lipoyl synthase, additional specific ISC targeting factors are required, such as IND1/NUBPL1, NFU1 and the GRX5 interaction partner BOLA3 [36] (Fig. 2).

Grx5 deficiency in *S. cerevisiae*, zebrafish or human diminishes the activities of mitochondrial and extra-mitochondrial Fe/S proteins and impairs haem biosynthesis [32,33,69–71]. Further, Grx5 deficiency is associated with a massive deregulation of cellular iron uptake systems and mitochondrial iron overload in yeast. Together, these features are the hallmark of the characteristic phenotype observed upon defects in the core ISC system. In addition, yeast *grx5Δ* cells lose mitochondrial DNA, a phenotype they share with the late ISC factors Isa1, Isa2 and Iba57 that are essential for the formation of mitochondrial [4Fe–4S] proteins [64,72,73]. Taken together, this complex phenotype indicates that Grx5 occupies a central position in the ISC assembly line, connecting the early parts of the ISC system that are dedicated to the *de novo* synthesis of [2Fe–2S] clusters with the late parts of the ISC system that are involved in (1) the transfer of [2Fe–2S] clusters to recipient apo-proteins, (2) the formation and export of X-S required for the maturation of cytosolic and nuclear Fe/S proteins and (3) the conversion of [2Fe–2S] clusters into [4Fe–4S] clusters and their insertion into [4Fe–4S] apo-proteins [11,36,74,75] (Fig. 2). Despite this central position, GRX5 is, unlike most genes of early ISC components, not essential for viability of *S. cerevisiae* indicating its function can be bypassed. Still, *S. cerevisiae* lacking Grx5 are severely compromised, indicating that this bypass is inefficient. Consistently, its deletion is lethal in insects, zebrafish, *Arabidopsis thaliana*, human cells under high oxygen conditions, and GLRX5 mutations in humans are associated with severe mitochondrial disorders [69–71,76,77].

The function of Grx5 in the context of the mitochondrial ISC system is intimately linked to its ability to assemble a labile [2Fe–2S] cluster that can be subsequently transferred to apo-proteins (Fig. 2). Consistently, *S. cerevisiae* Grx5 can be replaced by diverse monothiol Fe/S GRXs from different species *in vivo*, including those with variations in the classical CGFS active site motif [72,78,79]. Yet, *S. cerevisiae* Grx5 cannot be replaced by dithiol GRXs [24,78]. In *S. cerevisiae*, Fe/S cluster build-up on Grx5 *in vivo* depends on all components of the early parts ISC machinery, plus the Hsp70 chaperone Ssq1/Jac1 [63]. Further, low levels of yeast Grx5 result in the accumulation of Fe/S clusters on the scaffold Isu1, a phenotype that is shared with cells depleted for the

Hsp70 chaperone Ssq1 and its co-chaperone Jac1 [33]. This indicates that Grx5 cooperates with this dedicated chaperone system in facilitating Fe/S cluster transfer from Isu1 to Fe/S recipient apo-proteins [60,61,63,80]. According to a detailed analysis of this interplay in *S. cerevisiae*, Isu1 binds to the specific peptide binding domain of Ssq1 in an ATP-dependent manner, while Grx5 simultaneously binds to a second unknown part of Ssq1 in an ATP-independent manner. ATP hydrolysis by Ssq1 weakens Fe/S cluster binding on Isu1 and the simultaneous binding of holo-Isu1 and Grx5 likely facilitates efficient Fe/S cluster transfer to Grx5. This Hsp70-mediated Fe/S cluster transfer is consistent with the observation that the bacterial HscA/HscB orthologs stimulate Fe/S cluster transfer from IscU to Grx5 *in vitro* [81,82]. Analog *in vitro* support for the eukaryotic system is so far missing and an alternative role of the human mitochondrial Hsp70 system in [2Fe–2S] cluster transfer from human NFU1 to client apo-proteins has been suggested based on *in vitro* studies [83]. Yet, the relevance of this conclusion for the situation *in vivo* is questionable, since in contrast to GRX5, there is no evidence that NFU1 is involved in the maturation of [2Fe–2S] proteins *in vivo* [84].

### 3.1.2. Glutaredoxin 5 functions in Fe/S cluster transfer

The [2Fe–2S] cluster bound to monothiol GRXs, including mitochondrial Grx5, is intrinsically labile and its rapid transfer to apo-proteins *in vitro* is well documented [11,31,75,76,78,85–89]. This feature is also true for the U-type Fe/S assembly proteins ISCU, SuFu and NFU1 [90–95] and the A-type Fe/S assembly proteins ISCA, SUFA, ErpA [67,68,89,96–98]. These have been assigned as Fe/S cluster “transfer” or “carrier” proteins on the basis that they accommodate Fe/S clusters upon chemical reconstitution that are transferred to recipient apo-proteins *in vitro* [99]. Yet the relevance of an *in vitro* Fe/S cluster transfer for a physiological role as a direct Fe/S cluster transfer protein *in vivo* is unclear, because the vast majority of transfer assays reported in the literature were carried out in the presence of artificial thiol-specific reductants such as DTT and were carried out with partners from different species and/or different cellular compartments. This is also true for *in vitro* Fe/S transfer reactions involving mitochondrial Grx5 or its cytosolic counterpart Grx4 as Fe/S cluster donors to [2Fe–2S] ferredoxins [85,100], to the human A-type proteins ISCA1 and ISCA2 [88,89] or as Fe/S cluster acceptors from A-type or U-type Fe/S assembly proteins [93]. The catalytic effects of non-physiological thiol-specific reductants are unclear and raise doubts concerning the relevance of *in vitro* assays employing these substances for the situation *in vivo*. This is especially true for DTT which is known to poison the physiological reaction path of Fe/S cluster synthesis on ISCU2 [56,57]. *In vitro* studies in which artificial thiol specific reductants have been avoided in favour of natural ones are rare and include the Hsp70-mediated Fe/S cluster transfer from bacterial IscU to Grx5 *in vitro* [81] and that from cytosolic Grx4 to the transcription factor Aft2 [101]. A recent systematic study showed that the presence of the natural thiol-specific GSH/dithiol GRX system introduces substrate specificity to *in vitro* Fe/S cluster transfer reactions. Fe/S cluster transfer from human GRX5 to human FDX1, a likely physiological client protein, was very much faster in the presence of GSH/GRX than in the presence of DTT and much faster than to an apo-ferredoxin from a different species [102]. Furthermore, rates of Fe/S cluster transfer from GRX5 to apo-FDX1 were by several orders of magnitude higher than from the other known mitochondrial ISC assembly factors that can bind Fe/S-clusters, i.e. ISCU2, ISCA1, ISCA2 and NFU1. This kinetic disadvantage makes a role of these latter ISC factors as Fe/S cluster donors for simple mitochondrial [2Fe–2S] proteins in the presence of GRX5 unlikely.

As mentioned above, the phenotype of yeast cells lacking Grx5 overlaps with that of cells lacking the late ISC factors, Isa1, Isa2 and Iba57 that are involved in the formation of [4Fe–4S] clusters which indicates a central role of mitochondrial Grx5 in this process. The mechanism underlying the conversion of [2Fe–2S] into [4Fe–4S] clusters by late-acting ISC factors is hitherto poorly defined. The

condensation of the oxidised low potential  $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$  clusters produced by the early ISC system into an oxidised low potential  $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$  cluster requires the input of two electrons. In the test tube, this reductive coupling is mediated by DTT explaining why artificial reductants are present in all published transfer schemes involving  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ -cluster donors and  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ -cluster acceptors (for examples, see [15,88,103–106]). However, the condensation of  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  clusters into  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$  clusters is not spontaneous *in vivo* and consistently, the natural GSH/GRX or TRX systems do not support reductive coupling [102]. In *S. cerevisiae*, deletion of the *ISA1*, *ISA2*, or *IBA57* genes elicits identical phenotypes of a general mitochondrial  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$  protein deficiency indicating that each of these late ISC assembly factors plays an indispensable role in this process [64–66]. In yeast, there is a genetic interaction of *ISA1* and *ISA2* with *GRX5* [107], and human GRX5 interacts with and transfers  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  clusters to ISCA1 and ISCA2 *in vitro*, suggesting that GRX5 provides  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  clusters for the formation of  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$  proteins [67,68,88,89]. Indeed, the reconstitution of the mitochondrial  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$  protein aconitase in a DTT-free system *in vitro* showed that GRX5 ultimately serves as source of Fe/S clusters [102]. Consistent with *in vivo* findings, generation and assembly of  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$  clusters on aconitase essentially requires the late factors ISCA1, ISCA2, and IBA57, yet additionally requires reduced mitochondrial ferredoxin FDX2 for reductive  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  cluster condensation [102]. Assembly was not supported by the second mitochondrial ferredoxin FDX1, a protein involved in steroid production. Presumably, FDX2 specifically supports reductive coupling of  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  clusters, a requirement that was previously impossible to assess *in vivo* due to the early FDX2 function in *de novo*  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  cluster synthesis on ISCU2.

### 3.2. Mitochondrial BolA proteins – interaction partners of glutaredoxin 5?

Monothiol glutaredoxins interact with BolA proteins. They form hetero-dimeric complexes that bind a  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  cluster upon chemical reconstitution *in vitro* or upon incubation of Fe/S GRX homo-dimers with BolA [108–116]. Two BolA subfamilies have been distinguished based on the nature of the ligands assumed to bind the  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  cluster, those having a cysteine residue (BolA\_C group) and those having a conserved histidine residue (BolA\_H) in addition to an invariant histidine [116]. Many eukaryotes, including fungi and humans, possess two mitochondrial BolA proteins, the BolA\_H group BOLA1 (Bol1 in yeast), and the BolA\_C group BOLA3 (Bol3 in yeast) [109,110,113,117–120]. *In vitro*, complex formation between human GRX5 and BOLA1 stabilises the bound Fe/S cluster, while the complex of GRX5 with BOLA3 is rather unstable [110,118]. The *in vivo* roles of both proteins in Fe/S cluster biogenesis were extensively analysed in *S. cerevisiae* [118,119]. These analyses showed that the phenotypes of *bol1Δ/bol3Δ* deletion mutants are significantly different from those of cells lacking Grx5. *S. cerevisiae* cells lacking either Bol1 or Bol3 display no iron-related phenotype. Consistently, depletion of BOLA1 in human tissue culture does not yield a consistent phenotype [121]. Further, *S. cerevisiae* cells lacking both Bol1 and Bol3 do not show any defects in activity or maturation of mitochondrial  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  proteins, cytosolic Fe/S proteins and do not show any signs of a deregulated cellular iron uptake. This is in sharp contrast to cells lacking Grx5 and indicates that Grx5-Bol hetero-complexes do not play a major role in the maturation of mitochondrial  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  proteins [118,119]. Yet *bol1Δbol3Δ* cells display severe defects in lipoylation of the E2 subunits of the mitochondrial 2-oxoacid dehydrogenases that point towards defects in the mitochondrial lipoate synthase, a radical SAM Fe/S protein. Further, these cells show slight defects in the activities of aconitase and respiratory complex II, yet the maturation of other mitochondrial  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$  proteins is virtually unaffected. Consistently, patients with mutations in *BOLA3* displayed strong lipoylation defects of mitochondrial proteins [117,122–124]. The activities of respiratory complexes I and II are reduced, yet aconitase activity was normal. The weak effects seen on these mitochondrial Fe/S proteins are likely indirect effects of

lipoylation deficiency that strongly affects the citric acid cycle and the glycine cleavage system. Similar effects were seen in mice, where a fat-specific deletion of *BOLA3* significantly reduces protein lipoylation in brown adipose tissue [125]. Taken together, these phenotypes point towards a specific, auxiliary function of Bol1 and Bol3 for lipoic acid synthase cofactor maturation and/or activity. Whether this function includes complex formation with Grx5 as suggested from human patient analysis is unknown (see below) [126].

### 3.3. GRXS15-ISC machinery in plants

The plant ISC machinery likely works as those found in other eukaryotes, since all identified components are present in *A. thaliana*. Owing to some green lineage-specific gene duplications, the number of proteins involved is even higher considering the existence of two FDX, HSCA, MGE1 and NFU representatives and of three ISCU and ISCA representatives instead of 1 and 2 members respectively in most non-photosynthetic organisms [42]. This should not modify the overall ISC system function, but just influence which one of the paralogs is implicated as a function of its spatio-temporal cellular/tissue expression pattern. Most terrestrial plants have a single GRXS15 isoform but 2 to 3 isoforms seem present in non-vascular plants (moss, fern) and some monocot species [7]. As the sole monothiol GRX in Arabidopsis mitochondria and with ~30–35% identity with human GRX5 and yeast Grx5, it would be expected that AtGRXS15 possesses the same functions. While it is able to bind a  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  cluster in a homo-dimer that is stabilised by GSH [76], AtGRXS15 and its poplar ortholog do not (or very poorly) complement the yeast *grx5Δ* mutant [76,78]. This lack of complementation is best explained so far by the inability of plant GRXS15 to interact with at least some of the yeast Grx5 partners and may be due to the presence of an intrinsically-disordered N-terminal extension of *ca* 30–40 amino acids that is only found in plant and parasite members. In the *Trypanosoma brucei* monothiol GRX, some amino acids present in this region were proposed to modulate the active-site conformation and dynamics through a network of polar and hydrophobic interactions between residues from  $\alpha 1$  and  $\alpha 3$  [127]. This modifies the GSH binding pocket and supposedly Fe/S cluster binding. Interestingly, *T. brucei* monothiol GRX does not or very poorly complement the yeast *grx5Δ* either [128].

Another notable difference between *S. cerevisiae* and *A. thaliana* is that an *A. thaliana grxs15* knock-out mutant is embryo-lethal revealing that the protein is essential for plant viability [76]. Hence, either there are no existing bypass pathways as compared to the yeast situation or AtGRXS15 fulfils additional functions. The study of RNAi *grxs15* knock-down lines revealed a primary defect in the mitochondrial lipoic acid synthase which translates into reduced levels of lipoylated proteins such as the H subunits of the glycine cleavage system and the E2 subunits of the pyruvate dehydrogenase complex [129]. The study of a *grxs15* knock-out mutant complemented by a K83A variant affected in GSH and Fe/S cluster binding pointed to an additional moderate decrease in aconitase activity [76]. All these defects result in decreased root respiration. Overall, this suggests that GRXS15 is essential because of a specific involvement in Fe/S cluster maturation of lipoic acid synthase. Noteworthy, an affinity purification approach coupled to mass spectrometry revealed a potential interaction between AtGRXS15 and another protein of the TCA cycle, the isocitrate dehydrogenase regulatory subunit 1 (AtIDH1) [130]. Although the interaction has been confirmed by yeast two-hybrid (Y2H) and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays, its physiological relevance has yet to be studied.

### 3.4. Are monothiol glutaredoxins involved in the maturation of Fe/S proteins in plastids?

Chloroplasts or plastids have a dedicated Fe/S cluster assembly machinery, referred to as “Sulphur mobilisation” (SUF) machinery

[42,43]. It is particularly important, as numerous essential Fe/S proteins are present in this organelle ensuring functions in photosynthetic electron transport chain, nitrogen and sulphur assimilation, branched-chain amino acid or vitamin biosynthesis for example [131]. So far, 17 proteins are assumed to be involved in the *de novo* synthesis, trafficking and insertion of Fe/S clusters into acceptor proteins. With the exception of the cysteine desulphurase, the early assembly complex of the SUF system involves proteins that belong to different classes as compared to ISC early-acting proteins. However, after the *de novo* assembly of the Fe/S cluster on the SUFBCD scaffold, the next steps are assumed to be similar to those employed by the ISC machinery because the actors belong to the same classes (ISCA/SUFA, IBA57, NFU, GRX and BOLA) (for more information about the SUF machinery, see [131].) Two monothiol GRXs, referred to as GRXS14 and GRXS16, are present in chloroplasts and are able to bind the classical [2Fe–2S] cluster using glutathione molecules as exogenous ligands [78,132]. The major difference between both proteins is the presence of an additional N-terminal domain with endonuclease activity in GRXS16, suggesting a potential role in plastidial genome maintenance [133,134]. The capacity of GRXS14 and GRXS16 to interact with all chloroplastic proteins containing a BOLA domain (BOLA1, BOLA4 and SUFE1) was reported using both *in vivo* and *in vitro* approaches (yeast two-hybrid, bimolecular fluorescence complementation and co-expression in *E. coli*) [120,135]. Evidence about Fe/S cluster binding by GRX-BOLA hetero-complexes have been obtained for both chloroplastic GRXS14 and GRXS16 with BOLA1 [116,135]. Concerning their precise molecular functions, the most solid evidence pointing towards a role of GRXS14 and S16, and of BOLA1 and BOLA4 in the maturation of Fe/S proteins comes from their capacity to complement the corresponding yeast *grx5Δ* or *bol1Δ/bol3Δ* deletion mutants [78,136]. Additional evidence are the observed unidirectional [2Fe–2S] cluster transfer from a holo-GRXS14 to an apo-SUFA1, the sole plastidial A-type protein [87], and to an apo-FDX2 [22,78]. The transfer to apo-FDX2 is inhibited by GSH suggesting that GSH might control Fe/S cluster trafficking from GRXs [22]. This study also highlighted that the GSH molecules serving as ligands in the [2Fe–2S]-cluster bound forms of GRXs are unstable and can be exchanged with free GSH, explaining the beneficial effect of adding GSH in buffers used for protein purification. The last biochemical evidence is the report of an Fe/S cluster transfer from [2Fe–2S] cluster-bound NFU2 to GRXS16 but not to GRXS14, this result pointing to the existence of biochemical differences between both plastidial monothiol GRXs [105]. However, at this point, there is little *in planta* evidence supporting the involvement of plastidial GRXs and BOLAs in the maturation of plastidial Fe/S proteins. Indeed, Arabidopsis mutant lines for *BOLA1* and *BOLA4* have not been described yet, and those for *GRXS14* and *GRXS16* do not show a phenotype when grown in standard conditions. Only plants combining a *GRXS14* depletion with a decreased level of *GRXS16* obtained by RNAi approach or by co-suppression effect, show moderate growth defects under standard condition [137]. Interestingly, *GRXS14* overexpressing lines exhibit a better growth but decreased chlorophyll content. The latter was also observed in *grxS14* mutants by applying dark conditions such as dark-induced senescence occurring upon leaf coverage. All of this may indicate a link with the numerous Fe/S enzymes involved in chlorophyll metabolism but more definitive proofs are needed [131,137].

#### 4. Functions of multi-domain class II glutaredoxins

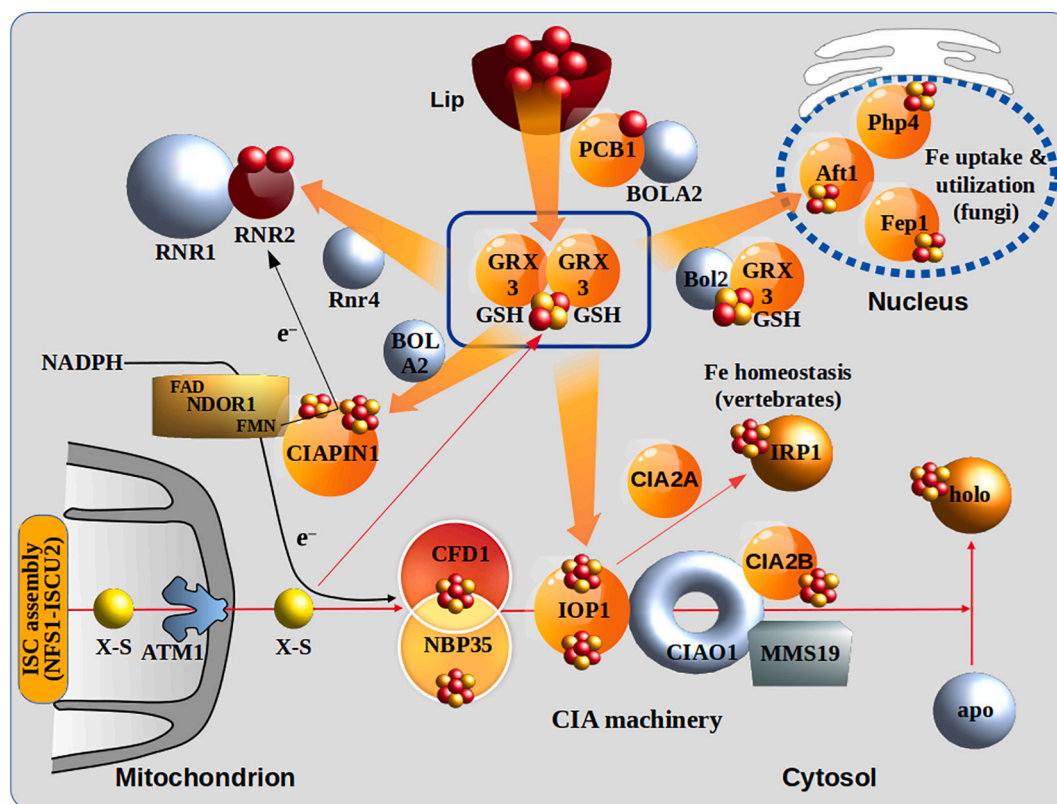
The cytosolic/nuclear multi-domain GRXs belong to a subgroup of GRXs that possess a tandem organisation of an N-terminal TRX domain followed by one, two or three C-terminal GRX domains connected by short, non-conserved linkers [8,11,14,75]. The overall architecture of the GRX domain is typical, and binds a bridged [2Fe–2S] cluster in a homo-dimeric complex using the same coordination sites as single domain GRXs [100,112,138,139]. The TRX domain adopts a typical TRX-fold, yet does not possess thiol-reductase activity as its WAXPC active

site motif lacks the conserved nucleophilic cysteine of TRXs [140]. The TRX active-site cysteine is required for the glutathione-S-transferase activity of multi-domain GRXs and there is evidence that this activity is indeed utilized by *S. cerevisiae* for detoxification [140,141]. In *S. cerevisiae*, the TRX domain is essential for viability [24], yet, the active-site cysteine of the TRX domain is not and its absence does not affect Fe/S cluster binding *in vivo*, demonstrating that the Fe/S cluster on multi-domain GRXs is bound exclusively by the GRX domains [142]. Multi-domain GRXs are ubiquitous in eukaryotes but are not present in bacteria or archaea. In many fungi, cytosolic monothiol GRXs are essential, including *Aspergillus fumigatus*, some *S. cerevisiae* strain backgrounds, and for fission yeast *S. pombe* under aerobic, but not under semi-anaerobic conditions [142–145]. In mammals, the cytosolic monothiol GRX3 is essential for embryonic development, post-embryonic growth, and heart function [146]. In plants, the *GRXS17* ortholog is also required for post-embryonic growth and becomes indispensable under certain conditions of temperature and photoperiod, the growth being arrested by the combination of high temperature and long photoperiod [138].

##### 4.1. Role of cytosolic glutaredoxins in iron trafficking

In *S. cerevisiae*, the depletion of cytosolic and nuclear paralogs, Grx3 and Grx4 (Grx3/4), induces multiple defects in cellular iron metabolism, affecting iron loading of several classes of iron-dependent proteins in the cytosol and impairs mitochondrial iron supply. At the same time, cells display cytosolic iron overload and a massive cellular GSH increase indicating that cytosolic/nuclear multi-domain GRXs are essential for intracellular trafficking of bioavailable iron required for the assembly of iron-containing proteins in fungi [142]. In zebrafish embryos, GRX3 depletion induces defects in haemoglobin maturation [147]. In human cell culture, GRX3 is required for the activity of several Fe/S proteins and its depletion induces a deregulated cellular iron uptake that is due to reduced Fe/S cluster binding on cytosolic iron-regulatory protein 1 (IRP1). Yet, in comparison to *S. cerevisiae*, these iron-related defects are mild [147]. Cytosolic GRXs physically interact with several components of the cytosolic CIA machinery that is essential for the maturation of cytosolic [4Fe–4S] proteins (Fig. 3). In *S. cerevisiae*, Grx3/4 binds to early CIA factor Dre2 (human CIAPIN1/anamorsin) [148] and is essential for Fe/S cluster assembly on Dre2 and the CIA factor Nar1 (IOP1 in human) [142,148]. Complex formation between cytosolic GRXS17/Grx3 and Dre2 has also been detected in *A. thaliana* and *Aspergillus fumigatus*, respectively [145,149]. The mammalian CIAPIN1/anamorsin forms a stable complex with GRX3 in human cells and in mice *in vivo* [150–152]. This interaction essentially requires the Fe/S cluster on GRX3 and the TRX domain [152]. This GRX3-CIAPIN1 complex also includes NDOR1, the di-flavin reductase that forms an electron transfer chain with CIAPIN1 that is required for the generation of the [4Fe–4S] clusters of the CIA factors CFD1 and NBP35 [44,150] (Fig. 3). Depletion of GRX3 and its BOLA2 partner reduces iron incorporation into CIAPIN1 in cultivated human cells *in vivo*, strongly suggesting that Fe/S clusters coordinated by GRX3 are directly transferred to CIAPIN1 in cells [150]. Transfer of [2Fe–2S] clusters from GRX3 to CIAPIN1 *via* hetero-dimeric complex formation was also demonstrated *in vitro*. Yet, this transfer was carried out in the presence of DTT and may thus not reflect a physiological pathway [152]. Moreover, how the second, essential [4Fe–4S] cluster is assembled remains unclear [153]. Cytosolic monothiol GRXs may interact with several CIA factors including those of the CIA targeting complex, Cia1 (CIAO1 in human), Mms19, and Cia2 [145,149,150]. The biochemical function of these interactions is as yet unclear.

The involvement of cytosolic GRXs in the maturation of non-Fe/S, iron-containing proteins is best studied with ribonucleotide reductase (RNR). This enzyme is essential for DNA replication and repair as it catalyses the conversion of nucleoside 5'-diphosphates (NDPs) to the corresponding deoxy-nucleotides [154]. Eukaryotic RNR is composed



**Fig. 3.** Cytosolic/nuclear monothiol glutaredoxins, central players of cellular iron trafficking and the regulation of cellular iron homeostasis.

The [2Fe–2S] clusters on the monothiol vertebrate GRX3, (human PICOT; Grx3/4 in *S. cerevisiae*, GRXS17 in *A. thaliana*) are central components of cellular iron metabolism. They play a pivotal role in the formation of cytosolic and nuclear [4Fe–4S] proteins by the CIA machinery. They are essential for the assembly of Fe/S clusters on the early CIA factors CIAPIN (Dre2) and IOP1 (Nar1) likely by direct Fe/S cluster transfer. Together with NDOR1 (Tah18), CIAPIN/Dre2 provides electrons required for the built-up of [4Fe–4S] clusters on the complex of the CIA factors CFD1 and NDP35. Defects in any of these CIA factors impair the formation of cytosolic/nuclear [4Fe–4S] proteins, including vertebrate iron-regulatory protein 1 (IRP1), which results in a de-regulated cellular iron uptake and storage. GRX3 is further involved in the maturation of the di-iron centre of the small subunit of ribonucleotide reductase, RNR2. This reaction also involves the input of electrons by with NDOR1/Tah18, CIAPIN/Dre2. In *S. cerevisiae*, low levels of Grx3/4 further affect the maturation of cytosolic iron- and haem-binding proteins and reduce iron supply to mitochondria and the vacuolar compartment. The assembly of [2Fe–2S]-clusters on GRX3 depends on GSH- and sulphur-containing solute (X-S) that is produced by the mitochondrial ISC system and transported into the cytosol via the mitochondrial ABC transporter ATM1. The building of [2Fe–2S]-cluster on GRX3 further requires cytosolic iron that is bound to diverse low molecular weight ligands. In mammals, iron transfer from this labile iron pool (LIP) is augmented by a complex of the iron-binding protein PCB1 and cytosolic BOLA2. PCBPs are absent in fungi. In fungi, cytosolic/nuclear Grx3/4, in concert with Bol2, communicate the cellular iron status to iron-responsive transcriptional factors such as the transcriptional activator Aft1 from *S. cerevisiae* or the (co-) repressors Php4 and Fep1 from *S. pombe*. These TFs control the expression of genes involved in iron uptake at the plasma membrane and intracellular iron utilisation. Grx3/4 and Bol2 physically interact with these TFs and the Grx3/4- or Grx3/4-Bol2-bound Fe/S-cluster functions as iron sensors for these TFs, triggering their activities.

of a large  $\alpha$  subunit that binds substrates and allosteric effectors and a small  $\beta$  subunit (Rnr2) that accommodates a diferric-tyrosyl radical  $\text{Fe}_2^{3+}\text{-Tyr}\cdot$  active site to initiate nucleotide reduction. *S. cerevisiae* RNR contains a second small  $\beta'$  subunit (Rnr4) that does not bind a cofactor, yet plays a critical role in facilitating iron insertion into the  $\beta$  subunit [155]. The formation of the  $\text{Fe}_2^{3+}\text{-Tyr}\cdot$  centre requires the  $\beta'$  subunit,  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{O}_2$  *in vitro*, with  $\text{Fe}^{2+}$  as electron source. In *S. cerevisiae*, RNR cofactor biosynthesis essentially involves the [2Fe–2S] cluster from Grx3/4 as iron source and the CIA factors Dre2 and Tah18 [142,148,156,157]. Dre2-Tah18 are required for RNR cofactor formation and RNR activity, but are dispensable for iron loading, suggesting that they provide reducing equivalents for metal cofactor assembly on Rnr2 *in vivo*. Since Grx3/4 and Dre2 are Fe/S proteins, cofactor formation on RNR indirectly depends on the mitochondrial ISC machinery. Yet, consistent with the CIA-independent maturation of Grx3/4, further CIA components acting downstream of Dre2 are not involved. Hence, Grx3/4 and Dre2-Tah18 play essential, non-overlapping roles as iron- and electron donors for the CIA system and metal centre formation on RNR.

#### 4.2. Cytosolic BOLA2 proteins - interaction partners with monothiol glutaredoxins

Many eukaryotes possess nuclear-cytosolic BOLA2 proteins that physically interact with cytosolic monothiol GRXs. Cytosolic BOLA2 proteins belong to the BOLA\_C group with a conserved cysteine and are thus related to the mitochondrial BOLA3 proteins [87,109,113,116]. With respect to fungi, the function of cytosolic Bol2 is tightly linked to that of cytosolic GRXs and there is no publication to date suggesting that Bol2 (alias Fra2 in many fungi) performs a GRX-independent function [87,109,115,158].

Upon co-expression in *E. coli* and/or *in vitro* Fe/S cluster reconstitution, cytosolic monothiol GRXs form stable hetero-dimeric complexes with BOLA2 proteins that are bridged by one or several [2Fe–2S] clusters [87,108,109,112,114–116,135,140]. The cluster is bound to one molecule of GSH, the GRX active-site cysteine, and, on the side of BOLA2, the universally conserved histidine residue between  $\alpha 3$  and  $\beta 3$  (His103 in Fra2) likely serves as a ligand. The latter is essential for function in *S. cerevisiae* *in vivo* [114]. *In vitro*, its replacement destabilises the [2Fe–2S] cluster in the GRX-BOLA2 complex, consistent with a change in cluster coordination. A conserved cysteine residue in the GCG

motif between  $\beta 1$  and  $\beta 2$  (Cys66 in Fra2) of BOLA2 is proposed to act as the fourth ligand in BOLA\_C proteins, even though a local conformational rearrangement would be necessary to place this residue in a position to serve as Fe/S cluster ligand. Yet, mutation of this conserved cysteine neither abolishes Fe/S cluster formation, nor significantly changes its spectroscopic signature. Its functional relevance *in vivo* is unknown [114].

In *S. cerevisiae*, Grx3/4 interacts with Bol2 in the cytosol in an iron-independent manner [159]. Consistent with this, NMR studies showed that BOLA2 proteins bind to apo-GRXs *via* an interaction involving the conserved helix-turn-helix domain of BOLA2 that would function as a nucleic acid binding region in some bacterial BOLA proteins [116,140,160]. This interaction does neither involve the invariant histidine of BOLA nor the active-site cysteine residue of GRXs. Instead, *S. cerevisiae* Bol2 binds to a patch of adjacent charged residues present in the last C-terminal  $\alpha$ -helical segment  $\alpha 4$  of Grx3 that is opposite to the GRX active site [140]. Interestingly, this C-terminal region is also the binding interface of Grx4 with the iron responsive transcription factor Aft1 from *S. cerevisiae* and essential for its regulation (see below) [24].

In *S. cerevisiae* and *S. pombe*, deletion of *Bol2* impacts the regulation of cellular iron uptake systems [159]. In *S. cerevisiae*, this deregulation is mild in comparison with that of cytosolic monothiol GRXs and *S. cerevisiae fra2Δ* shows no significant defects in the activity and maturation of Fe/S proteins [118]. In *S. pombe*, Bol2 impacts the function of the iron uptake regulator Fep1, while the function of Php4 is only regulated by cytosolic GRX (see below) [161,162]. There is no evidence for a role of Bol2 in other iron-related functions in *S. pombe*, and cytosolic BOLA proteins are missing in *Aspergilli* [145]. Taken together, fungal Bol2-GRX complexes are involved in some aspects of the regulation of iron-responsive TFs, while most of the iron-related functions of GRXs are carried out by GRXs in the absence of Bol2. In contrast to fungi, mammalian BOLA2 performs an important role in cellular iron metabolism. In human, loss of copies of BOLA2 due to a chromosomal deletion is associated with a prevalence for iron-deficiency anaemia [163]. Mice with reduced levels of BOLA2 and *BOLA2*-deficient mice show early evidence of iron deficiency, including a mild decrease in haemoglobin, lower plasma iron and increased zinc-protoporphyrin levels in erythrocytes [163]. In human cells, GRX3 forms stable complexes with BOLA2, yet unlike in yeast [2Fe–2S] cluster binding is necessary for complex formation and the size of the cellular pool of GRX3-BOLA2 complexes increases with cellular iron supply [150]. Similar to fungi, human GRX3 forms homo-dimers, yet these are unstable and their formation does not require a Fe/S cluster. *In vivo*, they are more abundant under iron-limiting conditions. Under iron-replete conditions, the majority of GRX3 is sequestered in complex with BOLA2. GRX3 and BOLA2 are both required for Fe/S cluster incorporation into CIAPIN1, despite the fact that BOLA2 is only loosely associated with CIAPIN1 *via* its interaction with GRX3 [150]. This indicates that GRX3 functions as a cytosolic [2Fe–2S] cluster chaperone in human cells, yet requires complex formation with the cytosolic BOLA2, to coordinate [2Fe–2S] clusters and transfer them to client apo-proteins *in vivo*.

Moreover, human BOLA2 forms binary complexes with the poly r(C)-binding protein PCBP1 [164]. In mammalian cells, the poly r(C)-binding protein (PCBP) family members facilitate iron delivery to cytosolic mono- and di-iron enzymes [165]. A PCBP1 ortholog is not present in fungi and plants. PCBP1-BOLA2 complexes bind iron and GSH *in vitro* and *in vivo*. On the side of BOLA2, iron is coordinated at the same His and Cys ligands that coordinate the Fe/S cluster in the BOLA2-GRX3 complex. Consistently, GRX3 competes with PCBP1 for binding to BOLA2. In cells lacking PCBP1, the binding of BOLA2 to GRX3 is diminished, suggesting that PCBP1 has a specific role in providing iron for the Fe/S cluster that is required for GRX3-BOLA2 complex formation. Therefore it was suggested that the PCBP1-BOLA2 complex functions as mediator for the transfer of iron from the cytosolic labile iron pool to GRX3. Yet, GRX3-BOLA2 complex formation in cells lacking PCBP1

could be restored by iron supplementation, indicating that PCBP1 is not essential for this process. Whether PCBP1-BOLA2 complexes deliver iron directly to other client iron proteins remains to be determined.

#### 4.3. Involvement of plant monothiol GRXS17 in cytosolic iron-sulphur protein assembly (CIA) machinery and beyond

The multi-domain GRXS17 from *A. thaliana* was purified with BOLA2 and most known CIA components using a tandem affinity purification strategy [149], but a physical interaction was only confirmed with BOLA2 and DRE2 using yeast two-hybrid and/or BiFC experiments [120,149,166]. The capacity of other CIA components to interact directly with GRXS17 will have to be examined to propose a specific role of GRXS17 in the late transfer steps, which has not been described so far in any organisms. Using DRE2 variants where the unstructured linker region that separates the N-terminal methyltransferase domain and the C-terminal domain is absent, it was shown that this region is important for the interaction with GRXS17 [166] confirming observations made with human proteins [152]. The Fe/S cluster transfer capacity of GRXS17 to DRE2 has not been directly addressed, but both poplar and Arabidopsis GRXS17 were shown to complement the yeast *grx5* mutant when expressed in the mitochondrial matrix, suggesting their ability to exchange Fe/S cluster(s) [138]. Whether BOLA2 is implicated in the maturation of DRE2, as suggested by studies focusing on human orthologs, remains to be determined. However, the fact that *grxs17* and *bola2* loss-of-function mutants are viable whereas Arabidopsis *dre2* null mutants are embryo-lethal suggests the existence of an alternative pathway for the maturation of the Fe/S clusters of DRE2 in plants [138,167,168]. This difference is also notable with most other mutants described for CIA components, which, except the *mms19/met18*, are embryo-lethal [169,170]. Similar to mutant plants defective for CIA components, *grxs17* knock-out mutants showed a certain degree of hypersensitivity to DNA damage suggesting defects in the maturation of some nuclear Fe/S dependent DNA repair enzymes, but this is less marked than in weak mutant alleles for the *DRE2* and *ASYMMETRIC LEAVES1/2 ENHANCER7 (AE7)/CIA2* genes [166,170].

Concerning the described effects on Fe/S client proteins, xanthine dehydrogenase (XDH1) and the cytosolic thiouridylase subunit 1 and 2 (CTU1 and CTU2) required for tRNA modification have been identified by tandem affinity purification to bind to GRXS17 and the interactions were confirmed by Y2H and BiFC [149]. However, neither XDH1 activity nor tRNA thiolation were reduced in the studied *grxs17* mutant. On the same line, the activity of other cytosolic Fe/S enzymes, acylase and aldehyde oxidases, are not or marginally modified even in high temperature conditions where the *grxs17* phenotype is exacerbated [138]. Altogether, these observations indicate that GRXS17 may contribute, but is not essential for the functioning of the CIA machinery, at least when plants are grown under standard conditions.

The *A. thaliana grxs17* loss-of-function mutant grown under standard conditions has a short root phenotype but essentially no shoot phenotype [138,171]. Pleiotropic developmental effects (curly leaves, loss of root gravitropism, delayed bolting) are seen when plants are grown under elevated temperature (28 °C), under a long photoperiod or continuous light (this effect being independent on the total light interception), ultimately leading to a total growth arrest when both constraints (long-day photoperiod and elevated temperature) are combined [138,171]. In these constraint conditions, GRXS17 was found to be required for the maintenance of the shoot apical meristem by controlling the cell division possibly serving as an integrator of both auxin and redox/GSH-dependent signals. Interestingly, DRE2 is proposed to have functions in the plant auxin response [166]. Whether the roles of DRE2 and GRXS17 are also connected in this context and dependent on the presence of the Fe/S cluster is unclear. Another evidence for the existence of a redox signalling function of GRXS17 comes from the isolation of a dozen of proteins unrelated to Fe- or Fe/S cluster metabolisms by affinity chromatography performed under non-reducing



conditions using His-tagged GRXS17 followed by elution with DTT [138]. The interaction with the nuclear factor Y subunit C11 (NF-YC11), confirmed to occur in the nucleus by BiFC, was proposed to be important for maintaining apical meristem functioning and thus plant growth under long-day conditions.

By analogy with fungal and animal models, important roles of GRXS17 and BOLA2 in the regulation of iron homeostasis are expected. Observations in favour of such an involvement are (i) the capacity of GRXS17 to reduce iron accumulation when expressed in a yeast *grx3/grx4* double mutant, (ii) the accentuated root growth phenotype of the *grxs17* mutant reported under iron deficiency conditions, (iii) the accumulation of iron (but also of many other metals/minerals) in seeds but not leaves, and (iv) the deregulation of the expression of some iron-responsive genes in the *grxs17* mutant grown under iron sufficiency and deficiency [172,173]. It was thus suggested that GRXS17 is required for tolerance to iron deficiency, and plays a negative regulatory role under conditions of iron sufficiency. On the contrary, the *bola2* mutant (erroneously referred to as *bola3* in the study) was reported to have no phenotype when grown under standard or iron deficiency conditions but to be more tolerant to excess iron than wild-type plants, exhibiting reduced leaf necrosis, developing longer roots and accumulating more iron in roots [168]. Altogether, these results indicate relatively peripheral and different roles for GRXS17 and BOLA in the response to iron availability in plants so far. Clearly, a deeper and more mechanistic analysis is required to solve the question of the implication of these nucleo-cytosolic proteins in the extremely complex network of bHLH transcription factors already described as involved in the regulation of iron homeostasis [174].

#### 4.4. Multi-domain glutaredoxins - regulators of iron-responsive transcription factors

With the likely exception of plants, cytosolic/nuclear multi-domain GRXs play a central role in cellular iron sensing in many eukaryotes. In vertebrates, this regulatory impact is indirect, as the GRX-induced CIA defects impair the maturation of Fe/S cluster on cytosolic iron-regulatory protein I (IRP1) which transforms this cytosolic aconitase into a constitutive mRNA-binding posttranscriptional regulator. Apo-IRP1 induces, among others, the translation of transferrin receptor at the plasma membrane and blocks the synthesis of ferritin, the major iron storage protein in vertebrates. In hematopoietic cells, apo-IRP1 further blocks the expression of delta-aminolevulinic synthase 2, the pace maker enzyme of haem biosynthesis. Thus, all cells with defects in the maturation of the Fe/S cluster of IRP1, including cytosolic/nuclear multi-domain GRXs and mitochondrial GRX5, behave similar to iron-deprived cells, and hematopoietic cells further display haem defects that may eventually cause sideroblastic anaemia (see Section 6). In all fungi studied, depletion of cytosolic/nuclear GRXs results in the deregulation of cellular iron uptake systems and disrupts the intracellular distribution and utilisation of iron [143,158,175–178]. Yet, in contrast to vertebrates, fungal cytosolic/nuclear GRXs regulate the activity of iron-responsive TF via direct physical complex formation in a post-translational manner. The CGFS active-site cysteine residue which is essential for Fe/S cluster binding is absolutely required for this function, collectively suggesting that the Fe/S clusters on cytosolic/nuclear multi-domain GRXs function as iron sensors for fungal TFs [142,144,145]. Fungal iron sensing has been studied most intensively in budding yeast *S. cerevisiae* and fission yeast *S. pombe* (for comprehensive reviews see [143,158,175,179,180]). Both yeasts utilise functionally and structurally unrelated iron-responsive regulators, yet both utilise cytosolic monothiol GRXs as iron sensors.

In *S. cerevisiae*, the adaptation to iron-limiting conditions is orchestrated by two iron-responsive TFs, Aft1 and Aft2, and the post-transcriptional degradation of mRNAs encoding proteins of iron-dependent biochemical pathways (for a comprehensive review, see [158,175,181]). Under iron-limiting conditions, Aft1/2 bind to specific

iron-response elements on target promoters and activate the expression of the yeast iron regulon, a set of genes that are mostly involved in the cellular uptake and intracellular distribution of iron. Upon iron sufficiency, Aft1 and Aft2 physically interact with cytosolic Grx3 or Grx4 and Bol2 (Fra2) in the nucleus which together promotes dissociation of Aft1/2 from target promoters and subsequent nuclear export [182]. Thus, the function of the cytosolic Grx3/4 (and Bol2) is to inactivate the transcriptional activator function of Aft1/2 under iron sufficiency. This easily explains why yeast cells with low levels of Grx3/4 or those expressing Grx3/4 mutants that can no longer bind their Fe/S cluster display a constitutive activation of iron regulon genes. Loss of Fe/S cluster binding by Grx3/4 most likely also explains why cells with defects in the mitochondrial ISC systems behave on the transcriptional level similar to iron-deprived yeast cells. The N-terminal part of Aft2 harbours its DNA binding domain and two conserved cysteine residues that are essential for deactivation of Aft1/2 under iron sufficiency [101]. Upon Fe/S cluster transfer from Grx3/Bol2 *in vitro* these conserved cysteines accommodate a [2Fe–2S]-cluster that bridges two monomers in a homo-dimeric Aft2 complex [101,183]. One of these cysteines is also required for the interaction with the Grx3/BolA2 complex. Most likely, this Fe/S cluster-induced dimerization of Aft2 reduces the affinity to target promoters. In addition, Bol2 has a higher affinity for Aft2 than Grx3 for Aft2, or Aft2 for target promoters. This suggests that the regulation of Aft1/2 further involves a change of the Bol2 binding partner from Grx3 to Aft1/2 [101,140,183].

In contrast to *S. cerevisiae*, most fungi orchestrate iron-responsive gene expression by the interplay of two conserved transcriptional repressors and this is best studied in fission yeast *S. pombe* and in the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* [158,175]. In *S. pombe*, the GATA-type transcription factor Fep1 represses genes involved in iron uptake under iron sufficiency [143,144,179,184]. The transcriptional co-repressor Php4 binds to the CCAAT-binding repressor complex (Php2/3/5) upon iron limitation, thereby promoting the repression of genes of iron-utilising pathways [143,161,185,186]. In *A. fumigatus* the transcriptional interplay of the repressors SreA (the ortholog of Fep1) and HapX (the ortholog of Php4) is in many ways similar, but not fully identical to that in *S. pombe* (for further details on the fungal pathogens systems see [145,175,176,180,187]).

*S. pombe* cells lacking Grx4 or harbouring Grx4 variants in which the GRX active-site cysteine residue is missing display constitutive low levels of genes involved in cellular iron uptake [144,161,184,188]. At the same time, the expression of genes of iron-consuming pathways remains constitutively low [189,190]. Thus, Grx4 is required for post-translational inactivation of the repressor functions of Php4 and Fep1 and *S. pombe* lacking Grx4 are unable to properly respond to both iron starvation and iron sufficiency. Php4 binds to the N-terminal TRX-domain of Grx4 in a constitutive manner and to the GRX domain in an iron-dependent manner [144,188–191]. The conserved GRX active-site cysteine residue of Grx4 and two conserved cysteine residues of Php4 are specifically required for this interaction and are likely involved in iron-mediated inactivation of Php4. Php4 shuttles between the nucleus and the cytosol, being imported in the nucleus under low iron conditions and exported in the cytosol by the exportin Crm1 in response to iron [189,190]. In cells lacking Grx4, Php4 remains firmly bound to the CCAAT-binding repressor complex in the nucleus. BolA2 is not involved in regulating Php4. In contrast, Fep1 constitutively localises to the nucleus and its repressor function is regulated via a physical complex with BolA2 and Grx4 in the nucleus. Deletion of BolA2, too, results in the constitutive association of Fep1 with target promoters and the constitutive repression of iron uptake genes [161,191].

There is growing evidence that fungal iron-responsive repressors are regulated by Fe/S cluster binding similar to *S. cerevisiae* Aft1/2. *S. pombe* Php4 and Grx4 and their orthologs in *Aspergillus fumigatus*, GrxD and HapX, are isolated as hetero-complexes upon co-expression in *E. coli* that harbour a bridged [2Fe–2S] cluster [145,162]. Consistent with *in vivo* findings above, mutation of the active-site cysteine of *S. pombe*

Grx4 or of two catalytically important residues of Php4 abolishes Fe/S cluster binding, but not complex formation. Further, the N-terminal domain of Fep1 from *S. pombe* or *Pichia pastoris* forms [2Fe-2S]<sup>2+</sup> cluster-binding homo-dimers when expressed in *E. coli* [184,192,193]. *S. pombe* Fep1 and orthologs from *Neurospora crassa* and *Histoplasma capsulatum* have also been reported to bind mononuclear iron upon recombinant expression in *E. coli* [191,194,195]. Fe or Fe/S clusters are ligated to four conserved central cysteines that modulate the affinity of Fep1 for DNA which easily explains how Grx4 and BolA2 modulate the affinity of Fep1 for target promoters. Taken together, the current literature suggests that fungal iron-responsive TFs are likely Fe/S proteins that are regulated via GRX-mediated Fe/S cluster association [175]. Yet, despite the accumulated *in vitro* evidence, the final proof that Aft1-, Php4- or Fep1-type regulators are indeed Fe/S proteins in their native hosts is still missing.

## 5. GRX2, a class I glutaredoxin with Fe/S cluster binding capacity

The first identified Fe/S-binding GRXs were class I dithiol GRXs, human GRX2 [9] and then poplar GRXC1 [20] which differ by their active site motifs. Other class I GRXs, for example yeast Grx6, Trypanosoma Grx1 and Arabidopsis GRXC5 were identified as Fe/S proteins, too (reviewed previously [109]), but the exact molecular function of all these holo-proteins is not elucidated so far. Therefore, physiological function of the Fe/S cluster coordination by class I GRXs is still enigmatic in most cases. Considering that mutational studies and tridimensional structures existing for class I Fe/S GRXs have been described in Section 2, this section uniquely focuses on GRX2 from animals.

GRX2 is a vertebrate-specific protein that is characterised by the existence of two additional cysteines forming a structural disulphide bond. GRX2 was identified in 2001 as the first mitochondrial mammalian GRX [196,197]. However, alternative splicing leads to three isoforms, one present in mitochondria and two present in cytosol/nucleus [196–199]. In mice and humans, the mitochondrial isoform and one of the cytosolic/nucleus isoforms are Fe/S proteins, whereas the second cytosolic/nuclear isoform is not able to coordinate the cofactor [198,199]. GRX2 functions as oxidoreductase regulating many physiological functions related, for example, to reorganisation of the cytoskeleton such as axonal and vessel outgrowth or cell migration [200–202]. The oxidoreductase activity is inhibited upon Fe/S cluster coordination which is explained by the fact that one of the Fe/S cluster ligands is the more N-terminal active site cysteine that initiates catalysis. Nevertheless, the majority of human GRX2 is present in its Fe/S form in cells as shown by Fe-55 labelling of cells followed by immunoprecipitation [9] as well as by a split-GFP fluorescence resonance energy transfer-based method [203]. Therefore, a physiological function related to the Fe/S cluster should be assumed for these class I GRXs. siRNA-mediated knock-down of GRX2 in a dopaminergic cell model was reported to moderately affect activities and iron content of mitochondrial aconitase and respiratory complex I [204]. Cells also displayed an induction of transferrin receptor. Yet, this effect is difficult to reconcile with a defective cytosolic Fe/S protein maturation, since cytosolic aconitase was normal. Although these data indicate a role of GRX2 in mitochondrial Fe/S protein assembly in vertebrates, further studies are required to clarify this point. If so, GRX2 would be the first known vertebrate-specific mitochondrial ISC component.

The Fe/S cluster of human GRX2 is disassembled by several molecules inducing oxidative damage, e.g. nitric oxide. Therefore, a function as redox sensor was proposed for the Fe/S cluster. Since GRX2 is able to receive electrons from thioredoxin reductase, GRX2 could be still active under oxidising conditions also affecting GSH availability [9]. The released iron after oxidative disassembly of holo-GRX2 was connected to the induction of ferroptosis [205]. To our knowledge, there is no description of a function clearly depending on the coordination of an Fe/S cluster in class I GRXs except detoxification of nitric oxide (see below).

## 6. Fe/S glutaredoxins in diseases

From three Fe/S GRXs in the human body, only one was so far directly linked to the formation of pathological phenotypes. Six patients with mutations in the *GLRX5* gene have been described. Three of them showed sideroblastic anaemia [70,71,206,207], a disease in which the bone marrow produces ringed sideroblasts rather than healthy erythrocytes. Sideroblastic anaemia is characterised by anaemia of varying severity, hypochromic erythrocytes, systemic iron overload, and chronic ineffective erythropoiesis. The Italian patient (male) displays a A > G mutation at position 294, the last nucleotide of exon 1 [70,71]. The *GLRX5* gene of a Chinese patient (male) contains two mutations – A301C and T443C – leading to the amino acid changes K101Q and L148S [206]. Finally, the GRX5 protein of a French patient (female) contains the mutations C67Y and M128L based on genetic mutations G200A and T383A [207]. K101 and L148 are involved in the coordination of carboxyl groups of glycine and glutamine, respectively, of the non-covalently bound GSH molecule that provides one of the Fe/S cluster ligands [11]. Cys67 is the active-site cysteine, second ligand of the Fe/S cluster [30]. M128 is suggested to be important for binding of interaction partners [207], e.g. for the delivery of the Fe/S cluster. The genetic mutation of the Italian patient leads to decreased splicing efficiency, severely reduced mRNA and subsequently GRX5 levels [70]. Thereby, all characterised mutations should attenuate the formation of both mitochondrial and extra-mitochondrial Fe/S proteins.

Based on data obtained in zebrafish [69], occurrence of sideroblastic anaemia in all patients was connected to decreased activity of delta aminolevulinic acid synthase 2 (ALAS2), the rate-limiting enzyme in erythroid haem biosynthesis. ALAS2 translation is inhibited by IRP1, the apo-form of the cytosolic aconitase. Although decreased ALAS2 activity was found in all patients, the French patient did not show decreased ALAS2 mRNA levels or increased IRP1 activity in contrast to the other patients indicating that the underlying molecular pathways are different. Of note, the French patient is younger (14 years compared to 29 and 44 years), female instead of male, and did not display signs of diabetes mellitus [70,206,207].

The three other patients with a mutation in *GLRX5* display a genetic deletion of nucleotides 151–153 leading to the lack of K51 [126]. One of these patients has an additional gene insertion leading to a stop codon directly after K51. All of these patients developed nonketotic hyperglycinemia [126], a disorder of the glycine metabolism that manifests with apnoea, hypertonia, and other problems directly after birth. These problems lead to spasticity, optic atrophy, and intellectual disabilities during childhood. Since the above-mentioned patients have no mutation in genes encoding enzymes of the glycine cleavage system, they belong to the group developing variant nonketotic hyperglycinemia [126]. The function of K51 is not clear. It is sitting at the surface opposite to C67 and the Fe/S cluster. Nevertheless, the proposed molecular mechanism is a disturbed Fe/S cluster biosynthesis. In this case, activity of lipoic acid synthase (LIAS) is decreased, which finally leads to inhibited activity of mitochondrial lipoylated enzymes, especially the glycine cleavage system and pyruvate dehydrogenase. Interestingly, mutations in the genes encoding BOLA3, the mitochondrial interaction partner of GRX5, and of further components essential for Fe/S cluster biosynthesis such as ISCA1/2 and NFU1 triggered formation of variant nonketotic hyperglycinemia as well [117,126,208,209].

Surprisingly, patients with general defects in mitochondrial function upon inhibited GRX5 function develop only two distinct pathologies. The tissue-specific anemic phenotype was explained by data showing that *GLRX5* is highly expressed in early erythroid cells [71]. In these cells, inhibition of ALAS2 translation by IRP1 and IRP2 is more pronounced than in other cell types. Moreover, in erythrocytes the activity of the Fe/S protein ferrochelatase, the last enzyme of haem biosynthesis, is inhibited as well [71]. The patients displaying variant nonketotic hyperglycinemia are very young (two 11 years old female patients with Lebanese background and one 7 years old boy from Taiwan) [126].

Follow-up studies will show whether these patients develop anaemia at later age. The different mutations seem not to be the reason for the different diseases. Both GRX5 L148S (one of the mutations of the Chinese anaemia patient) and GRX5 K51del (the common mutation leading to neurological disability) show similar defects regarding activities of Fe/S proteins related to anaemia (e.g. ferrochelatase) and variant nonketotic hyperglycinemia (lipoylation of proteins such as pyruvate dehydrogenase) in a cell line [210].

Defects in Fe/S cluster biosynthesis are related to several other pathologies. Disturbed Fe/S cluster biosynthesis followed by abolished lipoylation and hyperglycinemic syndromes were linked to pulmonary hypertension [211], obesity [125], leukoencephalopathy [122,124,125], and hypertrophic cardiomyopathy [124] via deficient BOLA3 activity in patients with mutations in the respective gene or via siRNA in disease models. This indicates that also GRX5 deficiency might play a role in many other diseases. Indeed, GRX5 levels are down-regulated in pancreatic islets, especially  $\beta$ -cells, in diabetic mice [212,213]. Recently, GRX5 encoding mRNA was found to be targeted by mir-152 in the context of heart failure [214]. This might link GRX5 to a variety of other diseases. Interestingly, mir-152 regulates the function of pancreatic  $\beta$ -cells during diabetes [215], but also many other cell functions in the context of rheumatoid arthritis [216] or different cancer types [217,218].

GRX3, the second monothiol GRX, demonstrated its importance in several animal models. Mice lacking GRX3 die already at embryonic day 12.5 because of defective cell cycle progression during late mitosis [146]. Regarding pathophysiology, GRX3 was mostly investigated in the context of diseases of the cardiovascular system. Zebrafish lacking GRX3 develop haem deficiency as GRX5-deficient zebrafish, but *IRP1* knockdown was not able to rescue the phenotype [147]. This indicates that GRX3 is more important for iron trafficking than for Fe/S cluster biosynthesis in both zebrafish and human cells [147]. GRX3 seems to be an important regulator of heart function. Its overexpression inhibits cardiac hypertrophy via increased ventricular function and cardiomyocyte contractility [219] and inhibition of both, the calcineurin-NFAT signalling pathway [220] and the activity of protein kinase C $\zeta$  [221]. The C-terminal GRX-domain of GRX3 alone is able to facilitate these protective mechanisms [220,221]. Moreover, GRX3 regulates myocardial ischemia-reperfusion via regulation of the labile iron pool [222]. Infarction was attenuated in *GRX3*-overexpressing mice, but exacerbated in *GRX3* knock-out mice [222].

The dithiol GRX2 is linked to several pathophysiological situations. GRX2 is present in the mitochondria - isoform GRX2a - and cytosol - isoform GRX2c. GRX2c was identified as cancer-specific isoform [198] and seems to be connected to tumour progression in patients suffering from clear cell renal cell carcinoma [223]. Decreased levels of GRX2 affect mitochondrial function and other issues related to a diabetic high fat mouse model. Unfortunately, the effect is not clear, since two publications described opposing effects. In contrast to wild-type mice, *GLRX2*<sup>+/-</sup> mice showed no increase in weight, in serum lipid deposition, and in insulin levels after high fat diet [224], whereas all these problems were exacerbated in *Grx2*<sup>-/-</sup> mice [225]. In the zebrafish model, GRX2 showed its importance during vertebrate embryonic development, especially cardiovascular and brain development [200–202]. However, all these functions are connected to the oxidoreductase function of GRX2. Its potential involvement in Parkinson's disease is also based on redox regulation, but affects Fe/S cluster biosynthesis [204]. GSH depletion in dopaminergic neurons, the cells dying during Parkinson's disease, inhibits GRX2 activity leading to decreased Fe/S cluster coordination in mitochondrial complex I and aconitase. The same phenotype was observed in dopaminergic cells after knock out of GRX2 expression via siRNA [204]. The only pathological situation that is directly connected to the Fe/S cluster coordinated by GRX2 is neuro-inflammation [226]. In a mouse model of multiple sclerosis, an inflammatory situation characterised by the loss of myelin, GRX2 levels are decreased. Increased levels of GRX2 protect

the myelin structure in an *ex vivo* model mimicking neuro-inflammation. The underlying molecular mechanism is the detoxification of nitric oxide that is secreted by immune cells and dangerous for myelin forming cells. The GSH-ligated Fe/S cluster of GRX2 reacts with nitric oxide to form an anti-apoptotic dinitrosyl-diglutathionyl-iron-complex and inhibits the formation of the harmful peroxynitrite [226].

## 7. Outlook

During the last 15 years the understanding of the biochemical and cell biological aspects of the Fe/S GRXs in eukaryotes has been coming of age. In particular, the role of mitochondrial Grx5 as a central component of the mitochondrial Fe/S cluster assembly system has become very well defined. Concerning the multi-domain class II GRXs, there is still uncertainty concerning their precise function in cellular iron metabolism, especially the apparent degree of importance of this protein in fungi, plants and vertebrates. Further, the precise unifying mechanism underlying the different roles of the cytosolic/nuclear GRXs that range from metal cofactor insertion into different classes of iron-dependent proteins to the so far ill-defined role in iron trafficking (in)to cell organelles still need to be unraveled. Whether these diverse functions exclusively involve the Fe/S cluster or are related to potential oxidoreductase activities of the apo-protein that are occasionally described in the literature (and not covered in this review) needs to be unraveled. The function of Fe/S cluster coordination by class I GRXs remains also mysterious for a large part. Yet, the major challenge that lies ahead is to tie together the substantial body of biochemical and cell biological knowledge of the Fe/S GRXs with the organ-related and systemic defects observed in zebrafish and mouse models and the systemic pathophenotypes of patients.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

### Funding

Researches of NR about glutaredoxins have been funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-18-CE92-0016-01; JC07\_204825 and ANR 2010 BLAN 1616 01). CB, and UM acknowledge the funding of their research on glutaredoxins by the German Research Association (DFG) (grant numbers to CB: BE5259/5-1, 2 and BE3259/6-1; to UM: CRC987, B2 and D5).

## References

- [1] A. Holmgren, Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73 (1976) 2275–2279.
- [2] M. Luthman, S. Eriksson, A. Holmgren, L. Thelander, Glutathione-dependent hydrogen donor system for calf thymus ribonucleoside-diphosphate reductase, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76 (1979) 2158–2162.
- [3] Z.R. Gan, M.A. Polokoff, J.W. Jacobs, M.K. Sardana, Complete amino acid sequence of yeast thioltransferase (glutaredoxin), Biochem. Biophys. Res. Commun. 168 (1990) 944–951.
- [4] K. Minakuchi, T. Yabushita, T. Masumura, K. Ichihara, K. Tanaka, Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding rice glutaredoxin, FEBS Lett. 337 (1994) 157–160.
- [5] J.L. Martin, Thioredoxin—a fold for all reasons, Structure 3 (1995) 245–250.
- [6] M.T. Rodriguez-Manzaneque, J. Ros, E. Cabiscol, A. Sorribas, E. Herrero, Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in Saccharomyces cerevisiae, Mol. Cell. Biol. 19 (1999) 8180–8190.
- [7] J. Couturier, J.P. Jacquot, N. Rouhier, Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms, Cell. Mol. Life Sci. 66 (2009) 2539–2557.
- [8] R. Alves, E. Vilaprinyo, A. Sorribas, E. Herrero, Evolution based on domain combinations: the case of glutaredoxins, BMC Evol. Biol. 9 (2009) 66.

- [9] C.H. Lillig, C. Berndt, O. Vergnolle, M.E. Lonn, C. Hudemann, E. Bill, A. Holmgren, Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 8168–8173.
- [10] J. Couturier, C. Didierjean, J.P. Jacquot, N. Rouhier, Engineered mutated glutaredoxins mimicking peculiar plant class III glutaredoxins bind iron-sulfur centers and possess reductase activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 403 (2010) 435–441.
- [11] C. Berndt, C.H. Lillig, Glutathione, Glutaredoxins, and Iron, *Antioxid Redox Signal*, 27 (2017), pp. 1235–1251.
- [12] E. Herrero, M.A. de la Torre-Ruiz, Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions, *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (2007) 1518–1530.
- [13] E. Herrero, G. Belli, C. Casa, Structural and functional diversity of glutaredoxins in yeast, *Curr. Protein Pept. Sci.* 11 (2010) 659–668.
- [14] C.H. Lillig, C. Berndt, A. Holmgren, Glutaredoxin systems, *Biochim. Biophys. Acta* 1780 (2008) 1304–1317.
- [15] B. Zhang, S. Bandyopadhyay, P. Shakamuri, S.G. Naik, B.H. Huynh, J. Couturier, N. Rouhier, M.K. Johnson, Monothiol glutaredoxins can bind linear [Fe3S4]+ and [Fe4S4]2+ clusters in addition to [Fe2S2]2+ clusters: spectroscopic characterization and functional implications, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 15153–15164.
- [16] A. Picciocchi, C. Saguez, A. Boussac, C. Cassier-Chauvat, F. Chauvat, CGFS-type monothiol glutaredoxins from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 and other evolutionary distant model organisms possess a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster, *Biochemistry* 46 (2007) 15018–15026.
- [17] C. Berndt, C. Hudemann, E.M. Hanschmann, R. Axelsson, A. Holmgren, C.H. Lillig, How does iron-sulfur cluster coordination regulate the activity of human glutaredoxin 2? *Antioxid. Redox Signal*. 9 (2007) 151–157.
- [18] C. Johansson, K.L. Kavanagh, O. Gileadi, U. Oppermann, Reversible sequestration of active site cysteines in a 2Fe-2S-bridged dimer provides a mechanism for glutaredoxin 2 regulation in human mitochondria, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 3077–3082.
- [19] N. Rouhier, H. Unno, S. Bandyopadhyay, L. Masip, S.K. Kim, M. Hirasawa, J.M. Gualberto, V. Lattard, M. Kusunoki, D.B. Knaff, G. Georgiou, T. Hase, M.K. Johnson, J.P. Jacquot, Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster in poplar glutaredoxin C1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 7379–7384.
- [20] Y. Feng, N. Zhong, N. Rouhier, T. Hase, M. Kusunoki, J.P. Jacquot, C. Jin, B. Xia, Structural insight into poplar glutaredoxin C1 with a bridging iron-sulfur cluster at the active site, *Biochemistry* 45 (2006) 7998–8008.
- [21] B. Manta, C. Pavan, M. Sturlese, A. Medeiros, M. Crispo, C. Berndt, R.L. Krauth-Siegel, M. Bellanda, M.A. Comini, Iron-sulfur cluster binding by mitochondrial monothiol glutaredoxin-1 of *Trypanosoma brucei*: molecular basis of iron-sulfur cluster coordination and relevance for parasite infectivity, *Antioxid. Redox Signal*. 19 (2013) 665–682.
- [22] L. Wang, B. Ouyang, Y. Li, Y. Feng, J.P. Jacquot, N. Rouhier, B. Xia, Glutathione regulates the transfer of iron-sulfur cluster from monothiol and dithiol glutaredoxins to apo ferredoxin, *Protein Cell* 3 (2012) 714–721.
- [23] S. Ceylan, V. Seidel, N. Ziebart, C. Berndt, N. Dirdjaja, R.L. Krauth-Siegel, The dithiol glutaredoxins of african trypanosomes have distinct roles and are closely linked to the unique trypanothione metabolism, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 35224–35237.
- [24] B. Hoffmann, M.A. Uzarska, C. Berndt, J.R. Godoy, P. Haunhorst, C.H. Lillig, R. Lill, U. Muhlenhoff, The multidomain thioredoxin-monothiol glutaredoxins represent a distinct functional group, *Antioxid. Redox Signal*. 15 (2011) 19–30.
- [25] J. Couturier, E. Stroher, A.N. Albetel, T. Roret, M. Muthuramalingam, L. Tarrago, T. Seidel, P. Tsan, J.P. Jacquot, M.K. Johnson, K.J. Dietz, C. Didierjean, N. Rouhier, Arabidopsis chloroplastic glutaredoxin C5 as a model to explore molecular determinants for iron-sulfur cluster binding into glutaredoxins, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 27515–27527.
- [26] J. Couturier, C.S. Koh, M. Zaffagnini, A.M. Winger, J.M. Gualberto, C. Corbier, P. Decottignies, J.P. Jacquot, S.D. Lemaire, C. Didierjean, N. Rouhier, Structure-function relationship of the chloroplastic glutaredoxin S12 with an atypical WCSYS active site, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 9299–9310.
- [27] D. Trnka, A.D. Engelke, M. Gellert, A. Moseler, M.F. Hossain, T.T. Lindenberg, L. Pedroletti, B. Odermatt, J.V. de Souza, A.K. Bronowska, T.P. Dick, U. Muhlenhoff, A.J. Meyer, C. Berndt, C.H. Lillig, Molecular basis for the distinct functions of redox-active and FeS-transferring glutaredoxins, *Nat. Commun.* 11 (2020) 3445.
- [28] L. Liedgens, J. Zimmermann, L. Waschenbach, F. Geissel, H. Laporte, H. Gohlke, B. Morgan, M. Deponte, Quantitative assessment of the determinant structural differences between redox-active and inactive glutaredoxins, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1725.
- [29] M. Abdalla, Y.N. Dai, C.B. Chi, W. Cheng, D.D. Cao, K. Zhou, W. Ali, Y. Chen, C.Z. Zhou, Crystal structure of yeast monothiol glutaredoxin Grx6 in complex with a glutathione-coordinated [2Fe-2S] cluster, *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* 72 (2016) 732–737.
- [30] C. Johansson, A.K. Roos, S.J. Montano, R. Sengupta, P. Filippakopoulos, K. Guo, F. von Delft, A. Holmgren, U. Oppermann, K.L. Kavanagh, The crystal structure of human GLRX5: iron-sulfur cluster co-ordination, tetrameric assembly and monomer activity, *Biochem. J.* 433 (2011) 303–311.
- [31] T. Iwema, A. Picciocchi, D.A. Traore, J.L. Ferrer, F. Chauvat, L. Jacquamet, Structural basis for delivery of the intact [Fe2S2] cluster by monothiol glutaredoxin, *Biochemistry* 48 (2009) 6041–6043.
- [32] M.T. Rodriguez-Manzanegue, J. Tamarit, G. Belli, J. Ros, E. Herrero, Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 1109–1121.
- [33] U. Muhlenhoff, J. Gerber, N. Richhardt, R. Lill, Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p, *EMBO J.* 22 (2003) 4815–4825.
- [34] R. Lill, B. Hoffmann, S. Molik, A.J. Pierik, N. Rietzschel, O. Stehling, M.A. Uzarska, H. Webert, C. Wilbrecht, U. Muhlenhoff, The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism, *Biochim. Biophys. Acta* 1823 (2012) 1491–1508.
- [35] G. Belli, M.M. Molina, J. Garcia-Martinez, J.E. Perez-Ortin, E. Herrero, Saccharomyces cerevisiae glutaredoxin 5-deficient cells subjected to continuous oxidizing conditions are affected in the expression of specific sets of genes, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 12386–12395.
- [36] R. Lill, S.A. Freibert, Mechanisms of mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis, *Annu. Rev. Biochem.* 89 (2020) 471–499.
- [37] R. Lill, J.B. Broderick, D.R. Dean, Special issue on iron-sulfur proteins: structure, function, biogenesis and diseases, *Biochim. Biophys. Acta* 1853 (2015) 1251–1252.
- [38] N. Maio, T.A. Rouault, Iron-sulfur cluster biogenesis in mammalian cells: new insights into the molecular mechanisms of cluster delivery, *Biochim. Biophys. Acta* 1853 (2015) 1493–1512.
- [39] S. Ciofi-Baffoni, V. Nasta, L. Banci, Protein networks in the maturation of human iron-sulfur proteins, *Metallomics* 10 (2018) 49–72.
- [40] C. Wachnowsky, I. Fidai, J.A. Cowan, Iron-sulfur cluster biosynthesis and trafficking - impact on human disease conditions, *Metallomics* 10 (2018) 9–29.
- [41] N. Maio, A. Jain, T.A. Rouault, Mammalian iron-sulfur cluster biogenesis: recent insights into the roles of frataxin, acyl carrier protein and ATPase-mediated transfer to recipient proteins, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 55 (2020) 34–44.
- [42] J. Couturier, B. Touraine, J.F. Briat, F. Gaynard, N. Rouhier, The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: current knowledge and open questions, *Front. Plant Sci.* 4 (2013) 259.
- [43] J. Balk, T.A. Schaedler, Iron cofactor assembly in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 65 (2014) 125–153.
- [44] V.D. Paul, R. Lill, Biogenesis of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins and their role in genome stability, *Biochim. Biophys. Acta* 1853 (2015) 1528–1539.
- [45] L.K. Beilschmidt, H.M. Puccio, Mammalian Fe-S cluster biogenesis and its implication in disease, *Biochimie* 100 (2014) 48–60.
- [46] O. Stehling, C. Wilbrecht, R. Lill, Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease, *Biochimie* 100 (2014) 61–77.
- [47] O. Stehling, V.D. Paul, J. Bergmann, S. Basu, R. Lill, Biochemical analyses of human iron-sulfur protein biogenesis and of related diseases, *Methods Enzymol.* 599 (2018) 227–263.
- [48] M. Cardenas-Rodriguez, A. Chatzi, K. Tokatlidis, Iron-sulfur clusters: from metals through mitochondria biogenesis to disease, *J. Biol. Inorg. Chem.* 23 (2018) 509–520.
- [49] P.P. Saha, V. Vishwanathan, K. Bankapalli, P. D'Silva, Iron-sulfur protein assembly in human cells, *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 174 (2018), pp. 25–65.
- [50] D.C. Johnson, D.R. Dean, A.D. Smith, M.K. Johnson, Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters, *Annu. Rev. Biochem.* 74 (2005) 247–281.
- [51] R. Lill, R. Dutkiewicz, S.A. Freibert, T. Heidenreich, J. Mascarenhas, D.J. Netz, V.D. Paul, A.J. Pierik, N. Richter, M. Stumpfig, V. Srinivasan, O. Stehling, U. Muhlenhoff, The role of mitochondria and the CIA machinery in the maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins, *Eur. J. Cell Biol.* 94 (2015) 280–291.
- [52] A. Parent, X. Elduque, D. Cornu, L. Belot, J.P. Le Caer, A. Grandas, M.B. Toledano, B. D'Autreaux, Mammalian frataxin directly enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to both ISCU and free thiols, *Nat. Commun.* 6 (2015) 5686.
- [53] J.G. Van Vranken, M.Y. Jeong, P. Wei, Y.C. Chen, S.P. Gygi, D.R. Winge, J. Rutter, The mitochondrial acyl carrier protein (ACP) coordinates mitochondrial fatty acid synthesis with iron sulfur cluster biogenesis, *eLife* 5 (2016).
- [54] S.A. Cory, J.G. Van Vranken, E.J. Brignole, S. Patra, D.R. Winge, C.L. Drennan, J. Rutter, D.P. Barondeau, Structure of human Fe-S assembly subcomplex reveals unexpected cysteine desulfurase architecture and acyl-ACP-ISP11 interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) E5325–E5334.
- [55] M.T. Boniecki, S.A. Freibert, U. Muhlenhoff, R. Lill, M. Cygler, Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex, *Nat. Commun.* 8 (2017) 1287.
- [56] S. Gervason, D. Larkem, A.B. Mansour, T. Botzanowski, C.S. Muller, L. Pecqueur, G. Le Pavec, A. Delaunay-Moisan, O. Brun, J. Agramunt, A. Grandas, M. Fontecave, V. Schunemann, S. Cianferani, C. Sizun, M.B. Toledano, B. D'Autreaux, Physiologically relevant reconstitution of iron-sulfur cluster biogenesis uncovers persulfide-processing functions of ferredoxin-2 and frataxin, *Nat. Commun.* 10 (2019) 3566.
- [57] H. Webert, S.A. Freibert, A. Gallo, T. Heidenreich, U. Linne, S. Amlacher, E. Hurt, U. Muhlenhoff, L. Banci, R. Lill, Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin, *Nat. Commun.* 5 (2014) 5013.
- [58] S.A. Freibert, A.V. Goldberg, C. Hacker, S. Molik, P. Dean, T.A. Williams, S. Nakjang, S. Long, K. Sendra, E. Bill, E. Heinz, R.P. Hirt, J.M. Lucocq, T.M. Embley, R. Lill, Evolutionary conservation and in vitro reconstitution of microsporidian iron-sulfur cluster biosynthesis, *Nat. Commun.* 8 (2017) 13932.
- [59] J.H. Kim, R.O. Frederick, N.M. Reinen, A.T. Troupis, J.L. Markley, [2Fe-2S]-ferredoxin binds directly to cysteine desulfurase and supplies an electron for iron-sulfur cluster assembly but is displaced by the scaffold protein or bacterial frataxin, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 8117–8120.
- [60] L.E. Vickery, J.R. Cupp-Vickery, Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42 (2007) 95–111.

- [61] H.H. Kampinga, E.A. Craig, The Hsp70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (2010) 579–592.
- [62] R. Dutkiewicz, M. Nowak, Molecular chaperones involved in mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis, *J. Biol. Inorg. Chem.* 23 (2018) 569–579.
- [63] M.A. Uzarska, R. Dutkiewicz, S.A. Freibert, R. Lill, U. Muhlenhoff, The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation, *Mol. Biol. Cell* 24 (2013) 1830–1841.
- [64] C. Gelling, I.W. Dawes, N. Richhardt, R. Lill, U. Muhlenhoff, Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes, *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 1851–1861.
- [65] U. Muhlenhoff, N. Richter, O. Pines, A.J. Pierik, R. Lill, Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 41205–41216.
- [66] A.D. Sheftel, C. Wilbrecht, O. Stehling, B. Niggemeyer, H.P. Elsasser, U. Muhlenhoff, R. Lill, The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation, *Mol. Biol. Cell* 23 (2012) 1157–1166.
- [67] L.K. Beiltschmidt, S. Ollagnier de Choudens, M. Fournier, I. Sanakis, M.A. Hograindleur, M. Clemancey, G. Blondin, S. Schmucker, A. Eisenmann, A. Weiss, P. Koebel, N. Messadeg, H. Puccio, A. Martelli, ISCA1 is essential for mitochondrial Fe4S4 biogenesis in vivo, *Nat. Commun.* 8 (2017) 15124.
- [68] S. Gourdupis, V. Nasta, V. Calderone, S. Ciofi-Baffoni, L. Banci, IBA57 recruits ISCA2 to form a [2Fe-2S] cluster-mediated complex, *J. Am. Chem. Soc.* 140 (2018) 14401–14412.
- [69] R.A. Wingert, J.L. Galloway, B. Barut, H. Foot, P. Fraenkel, J.L. Axe, G.J. Weber, K. Dooley, A.J. Davidson, B. Schmid, B.H. Paw, G.C. Shaw, P. Kingsley, J. Palis, H. Schubert, O. Chen, J. Kaplan, L.I. Zon, Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis, *Nature* 436 (2005) 1035–1039.
- [70] C. Camaschella, A. Campanella, L. De Falco, L. Boschetto, R. Merlini, L. Silvestri, S. Levi, A. Iolascon, The human counterpart of zebrafish shiraz shows side-robust-like microcytic anemia and iron overload, *Blood* 110 (2007) 1353–1358.
- [71] H. Ye, S.Y. Jeong, M.C. Ghosh, G. Kovtunovych, L. Silvestri, D. Ortillo, N. Uchida, J. Tisdale, C. Camaschella, T.A. Rouault, Glutaredoxin 5 deficiency causes side-robust anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 1749–1761.
- [72] M.M. Molina, G. Belli, M.A. de la Torre, M.T. Rodriguez-Manzanque, E. Herrero, Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 51923–51930.
- [73] L.T. Jensen, V.C. Culotta, Role of *Saccharomyces cerevisiae* ISA1 and ISA2 in iron homeostasis, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 3918–3927.
- [74] J.J. Braymer, R. Lill, Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria, *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 12754–12763.
- [75] N. Rouhler, J. Couturier, M.K. Johnson, J.P. Jacquot, Glutaredoxins: roles in iron homeostasis, *Trends Biochem. Sci.* 35 (2010) 43–52.
- [76] A. Moseler, I. Aller, S. Wagner, T. Nitzel, J. Przybyla-Toscano, U. Muhlenhoff, R. Lill, C. Berndt, N. Rouhler, M. Schwarzlander, A.J. Meyer, The mitochondrial monothiol glutaredoxin S15 is essential for iron-sulfur protein maturation in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) 13735–13740.
- [77] T. Ast, J.D. Meisel, S. Patra, H. Wang, R.M.H. Grange, S.H. Kim, S.E. Calvo, L.L. Orefice, F. Nagashima, F. Ichinose, W.M. Zapol, G. Ruvkun, D.P. Barondeau, V.K. Mootha, Hypoxia rescues Frataxin loss by restoring iron sulfur cluster biogenesis, *Cell* 177 (2019) 1507–1521 (e1516).
- [78] S. Bandyopadhyay, F. Gama, M.M. Molina-Navarro, J.M. Gualberto, R. Claxton, S.G. Naik, B.H. Huynh, E. Herrero, J.P. Jacquot, M.K. Johnson, N. Rouhler, Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters, *EMBO J.* 27 (2008) 1122–1133.
- [79] M.M. Molina-Navarro, C. Casas, L. Piedrafitra, G. Belli, E. Herrero, Prokaryotic and eukaryotic monothiol glutaredoxins are able to perform the functions of Grx5 in the biogenesis of Fe/S clusters in yeast mitochondria, *FEBS Lett.* 580 (2006) 2273–2280.
- [80] E.A. Craig, J. Marszalek, Hsp70 chaperones, eLS, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2011.
- [81] P. Shakamuri, B. Zhang, M.K. Johnson, Monothiol glutaredoxins function in storing and transporting [Fe2S2] clusters assembled on IscU scaffold proteins, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 15213–15216.
- [82] F. Bonomi, S. Iametti, A. Morleo, D. Ta, L.E. Vickery, Facilitated transfer of IscU-[2Fe2S] clusters by chaperone-mediated ligand exchange, *Biochemistry* 50 (2011) 9641–9650.
- [83] J.A. Olive, J.A. Cowan, Role of the HSPA9/HSC20 chaperone pair in promoting directional human iron-sulfur cluster exchange involving monothiol glutaredoxin 5, *J. Inorg. Biochem.* 184 (2018) 100–107.
- [84] A. Navarro-Sastre, F. Tort, O. Stehling, M.A. Uzarska, J.A. Arranz, M. Del Toro, M.T. Labayru, J. Landa, A. Font, J. Garcia-Villoria, B. Merinero, M. Ugarte, L.G. Gutierrez-Solana, J. Campistol, A. Garcia-Cazorla, J. Vaquerizo, E. Riudor, P. Briones, O. Elpeleg, A. Ribes, R. Lill, A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins, *Am. J. Hum. Genet.* 89 (2011) 656–667.
- [85] M. Jia, S. Sen, C. Wachnowsky, I. Fidai, J.A. Cowan, V.H. Wysocki, Characterization of [2Fe-2S]-cluster-bridged protein complexes and reaction intermediates by use of native mass spectrometric methods, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 59 (2020) 6724–6728.
- [86] V. Nasta, S. Da Vela, S. Gourdupis, S. Ciofi-Baffoni, D.I. Svergun, L. Banci, Structural properties of [2Fe-2S] ISCA2-IBA57: a complex of the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly machinery, *Sci. Rep.* 9 (2019) 18986.
- [87] D.T. Mapolelo, B. Zhang, S. Randeniya, A.N. Albetel, H. Li, J. Couturier, C.E. Outten, N. Rouhler, M.K. Johnson, Monothiol glutaredoxins and A-type proteins: partners in Fe-S cluster trafficking, *Dalton Trans.* 42 (2013) 3107–3115.
- [88] D. Brancaccio, A. Gallo, M. Mikolajczyk, K. Zovo, P. Palumaa, E. Novellino, M. Piccioli, S. Ciofi-Baffoni, L. Banci, Formation of [4Fe-4S] clusters in the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly machinery, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 16240–16250.
- [89] L. Banci, D. Brancaccio, S. Ciofi-Baffoni, R. Del Conte, R. Gadepalli, M. Mikolajczyk, S. Neri, M. Piccioli, J. Winkelmann, [2Fe-2S] cluster transfer in iron-sulfur protein biogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 6203–6208.
- [90] G. Wu, S.S. Mansy, S.P. Wu Sp, K.K. Surerus, M.W. Foster, J.A. Cowan, Characterization of an iron-sulfur cluster assembly protein (ISU1) from *Schizosaccharomyces pombe*, *Biochemistry* 41 (2002) 5024–5032.
- [91] P.C. Dos Santos, A.D. Smith, J. Frazzon, V.L. Cash, M.K. Johnson, D.R. Dean, Iron-sulfur cluster assembly: NifU-directed activation of the nitrogenase Fe protein, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 19705–19711.
- [92] K. Cai, G. Liu, R.O. Frederick, R. Xiao, G.T. Montelione, J.L. Markley, Structural/functional properties of human NFU1, an intermediate [4Fe-4S] carrier in human mitochondrial iron-sulfur cluster biogenesis, *Structure* 24 (2016) 2080–2091.
- [93] C. Wachnowsky, I. Fidai, J.A. Cowan, Iron-sulfur cluster exchange reactions mediated by the human Nfu protein, *J. Biol. Inorg. Chem.* 21 (2016) 825–836.
- [94] C. Wachnowsky, J.A. Cowan, In vitro studies of cellular iron-sulfur cluster biosynthesis, trafficking, and transport, *Methods Enzymol.* 595 (2017) 55–82.
- [95] E.L. McCarthy, S.J. Booker, Destruction and reformation of an iron-sulfur cluster during catalysis by lipoyl synthase, *Science* 358 (2017) 373–377.
- [96] S. Ollagnier-de-Choudens, T. Mattioli, Y. Takahashi, M. Fontecave, Iron-sulfur cluster assembly: characterization of IscA and evidence for a specific and functional complex with ferredoxin, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 22604–22607.
- [97] M. Wollenberg, C. Berndt, E. Bill, J.D. Schwenn, A. Seidler, A dimer of the FeS cluster biosynthesis protein IscA from cyanobacteria binds a [2Fe2S] cluster between two protomers and transfers it to [2Fe2S] and [4Fe4S] apo proteins, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 1662–1671.
- [98] S. Ollagnier-de-Choudens, Y. Sanakis, M. Fontecave, SufA/IscA: reactivity studies of a class of scaffold proteins involved in [Fe-S] cluster assembly, *J. Biol. Inorg. Chem.* 9 (2004) 828–838.
- [99] B. Roche, L. Aussenl, B. Ezraty, P. Mandin, B. Py, F. Barras, Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: formation, regulation and diversity, *Biochim. Biophys. Acta* 1827 (2013) 455–469.
- [100] S. Sen, J.A. Cowan, Role of protein-glutathione contacts in defining glutaredoxin-3 [2Fe-2S] cluster chirality, ligand exchange and transfer chemistry, *J. Biol. Inorg. Chem.* 22 (2017) 1075–1087.
- [101] C.B. Poor, S.V. Wegner, H. Li, A.C. Dlouhy, J.P. Schuermann, R. Sanishvili, J.R. Hinshaw, P.J. Riggs-Gelasco, C.E. Outten, C. He, Molecular mechanism and structure of the *Saccharomyces cerevisiae* iron regulator Aft2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 4043–4048.
- [102] B.D. Weiler, M.C. Bruck, I. Kothe, E. Bill, R. Lill, U. Muhlenhoff, Mitochondrial [4Fe-4S] protein assembly involves reductive [2Fe-2S] cluster fusion on ISCA1-ISCA2 by electron flow from ferredoxin FDX2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2020), <https://doi.org/10.1073/pnas.2003982117>.
- [103] J.N. Agar, C. Krebs, J. Frazzon, B.H. Huynh, D.R. Dean, M.K. Johnson, IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU, *Biochemistry* 39 (2000) 7856–7862.
- [104] D.T. Mapolelo, B. Zhang, S.G. Naik, B.H. Huynh, M.K. Johnson, Spectroscopic and functional characterization of iron-sulfur cluster-bound forms of *Azotobacter vinelandii* (Nif)IscA, *Biochemistry* 51 (2012) 8071–8084.
- [105] H. Gao, S. Subramanian, J. Couturier, S.G. Naik, S.K. Kim, T. Leustek, D.B. Knaff, H.C. Wu, F. Vignols, B.H. Huynh, N. Rouhler, M.K. Johnson, *Arabidopsis thaliana* Nfu2 accommodates [2Fe-2S] or [4Fe-4S] clusters and is competent for in vitro maturation of chloroplast [2Fe-2S] and [4Fe-4S] cluster-containing proteins, *Biochemistry* 52 (2013) 6633–6645.
- [106] K. Chandramouli, M.C. Unciuleac, S. Naik, D.R. Dean, B.H. Huynh, M.K. Johnson, Formation and properties of [4Fe-4S] clusters on the IscU scaffold protein, *Biochemistry* 46 (2007) 6804–6811.
- [107] K.D. Kim, W.H. Chung, H.J. Kim, K.C. Lee, J.H. Roe, Monothiol glutaredoxin Grx5 interacts with Fe-S scaffold proteins Isa1 and Isa2 and supports Fe-S assembly and DNA integrity in mitochondria of fission yeast, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392 (2010) 467–472.
- [108] A.N. Albetel, C.E. Outten, Characterization of glutaredoxin Fe-S cluster-binding interactions using circular dichroism spectroscopy, *Methods Enzymol.* 599 (2018) 327–353.
- [109] J. Couturier, J. Przybyla-Toscano, T. Roret, C. Didierjean, N. Rouhler, The roles of glutaredoxins ligating Fe-S clusters: sensing, transfer or repair functions? *Biochim. Biophys. Acta* 1853 (2015) 1513–1527.
- [110] V. Nasta, A. Giachetti, S. Ciofi-Baffoni, L. Banci, Structural insights into the molecular function of human [2Fe-2S] BOLA1-GRX5 and [2Fe-2S] BOLA3-GRX5 complexes, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1861 (2017) 2119–2131.
- [111] A.C. Dlouhy, H. Li, A.N. Albetel, B. Zhang, D.T. Mapolelo, S. Randeniya, A.A. Holland, M.K. Johnson, C.E. Outten, The *Escherichia coli* BolA protein IbaG forms a histidine-ligated [2Fe-2S]-bridged complex with Grx4, *Biochemistry* 55 (2016) 6869–6879.
- [112] H. Li, D.T. Mapolelo, S. Randeniya, M.K. Johnson, C.E. Outten, Human glutaredoxin 3 forms [2Fe-2S]-bridged complexes with human BOLA2, *Biochemistry* 51 (2012) 1687–1696.
- [113] H. Li, C.E. Outten, Monothiol CGFS glutaredoxins and BolA-like proteins: [2Fe-2S] binding partners in iron homeostasis, *Biochemistry* 51 (2012) 4377–4389.
- [114] H. Li, D.T. Mapolelo, N.N. Dingra, G. Keller, P.J. Riggs-Gelasco, D.R. Winge,

- M.K. Johnson, C.E. Outten, Histidine 103 in Fra2 is an iron-sulfur cluster ligand in the [2Fe-2S] Fra2-Grx3 complex and is required for in vivo iron signaling in yeast, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 867–876.
- [115] H. Li, D.T. Mapolelo, N.N. Dingra, S.G. Naik, N.S. Lees, B.M. Hoffman, P.J. Riggs-Gelascio, B.H. Huynh, M.K. Johnson, C.E. Outten, The yeast iron regulatory proteins Grx3/4 and Fra2 form heterodimeric complexes containing a [2Fe-2S] cluster with cysteinyl and histidyl ligation, *Biochemistry* 48 (2009) 9569–9581.
- [116] T. Roret, P. Tsan, J. Couturier, B. Zhang, M.K. Johnson, N. Rouhier, C. Didierjean, Structural and spectroscopic insights into BolA-glutaredoxin complexes, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 24588–24598.
- [117] J.M. Cameron, A. Janer, V. Levandovskiy, N. Mackay, T.A. Rouault, W.H. Tong, I. Ogilvie, E.A. Shoubridge, B.H. Robinson, Mutations in iron-sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes, *Am. J. Hum. Genet.* 89 (2011) 486–495.
- [118] M.A. Uzarska, V. Nasta, B.D. Weiler, F. Spantgar, S. Ciofi-Baffoni, M.R. Saviello, L. Gonnelli, U. Muhlenhoff, L. Banci, R. Lill, Mitochondrial Bol1 and Bol3 function as assembly factors for specific iron-sulfur proteins, *eLife* 5 (2016).
- [119] A. Melber, U. Na, A. Vashisht, B.D. Weiler, R. Lill, J.A. Wohlschlegel, D.R. Winge, Role of Nfu1 and Bol3 in iron-sulfur cluster transfer to mitochondrial clients, *eLife* 5 (2016).
- [120] J. Couturier, H.C. Wu, T. Dhalleine, H. Pegeot, D. Sudre, J.M. Gualberto, J.P. Jacquot, F. Gaymard, F. Vignols, N. Rouhier, Monothiol glutaredoxin-BolA interactions: redox control of Arabidopsis thaliana BolA2 and SufE1, *Mol. Plant* 7 (2014) 187–205.
- [121] P. Willems, B.F. Wanschers, J. Esseling, R. Szklarczyk, U. Kudla, I. Duarte, M. Forkink, M. Nooteboom, H. Swarts, J. Goerich, L. Nijtmans, W. Koopman, M.A. Huynen, BOLA1 is an aerobic protein that prevents mitochondrial morphology changes induced by glutathione depletion, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013) 129–138.
- [122] C.A. Stutterd, N.J. Lake, H. Peters, P.J. Lockhart, R.J. Taft, M.S. van der Knaap, A. Vanderver, D.R. Thorburn, C. Simons, R.J. Leventer, Severe leukoencephalopathy with clinical recovery caused by recessive BOLA3 mutations, *JIMD Rep.* 43 (2019) 63–70.
- [123] R.M. Nikam, K.W. Gripp, A.K. Choudhary, V. Kandula, Imaging phenotype of multiple mitochondrial dysfunction syndrome 2, a rare BOLA3-associated leukodystrophy, *Am. J. Med. Genet. A* 176 (2018) 2787–2790.
- [124] M. Nishioka, Y. Inaba, M. Motobayashi, Y. Hara, R. Numata, Y. Amano, K. Shingu, Y. Yamamoto, K. Murayama, A. Ohtake, Y. Nakazawa, An infant case of diffuse cerebrosplinal lesions and cardiomyopathy caused by a BOLA3 mutation, *Brain Dev.* 40 (2018) 484–488.
- [125] K. Tajima, K. Ikeda, H.Y. Chang, C.H. Chang, T. Yoneshiro, Y. Oguri, H. Jun, J. Wu, Y. Ishihama, S. Kajimura, Mitochondrial lipoylation integrates age-associated decline in brown fat thermogenesis, *Nat. Metab.* 1 (2019) 886–898.
- [126] P.R. Baker 2nd, M.W. Friederich, M.A. Swanson, T. Shaikh, K. Bhattacharya, G.H. Scharer, J. Aicher, G. Creardon-Swindell, E. Geiger, K.N. MacLean, W.T. Lee, C. Deshpande, M.L. Freckmann, L.Y. Shih, M. Wasserstein, M.B. Rasmussen, A.M. Lund, P. Procopis, J.M. Cameron, B.H. Robinson, G.K. Brown, R.M. Brown, A.G. Compton, C.L. Dieckmann, R. Collard, C.R. Coughlin 2nd, E. Spector, M.F. Wempe, J.L. Van Hove, Variant non ketotic hyperglycinemia is caused by mutations in LIAS, BOLA3 and the novel gene GLRX5, *Brain* 137 (2014) 366–379.
- [127] M. Sturlese, B. Manta, A. Bertarello, M. Bonilla, M. Lelli, B. Zambelli, K. Grunberg, S. Mammi, M.A. Comini, M. Bellanda, The lineage-specific, intrinsically disordered N-terminal extension of monothiol glutaredoxin 1 from trypanosomes contains a regulatory region, *Sci. Rep.* 8 (2018) 13716.
- [128] M. Filser, M.A. Comini, M.M. Molina-Navarro, N. Dirdjaja, E. Herrero, R.L. Krauth-Siegel, Cloning, functional analysis, and mitochondrial localization of *Trypanosoma brucei* monothiol glutaredoxin-1, *Biol. Chem.* 389 (2008) 21–32.
- [129] E. Stroher, J. Grassl, C. Carrie, R. Fenske, J. Whelan, A.H. Millar, Glutaredoxin S15 is involved in Fe-S cluster transfer in mitochondria influencing lipoid acid-dependent enzymes, plant growth, and arsenic tolerance in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 170 (2016) 1284–1299.
- [130] Y. Zhang, C. Swart, S. Alseekh, F. Scossa, L. Jiang, T. Obata, A. Graf, A.R. Fernie, The extra-pathway interactome of the TCA cycle: expected and unexpected metabolic interactions, *Plant Physiol.* 177 (2018) 966–979.
- [131] J. Przybyla-Toscano, M. Roland, F. Gaymard, J. Couturier, N. Rouhier, Roles and maturation of iron-sulfur proteins in plastids, *J. Biol. Inorg. Chem.* 23 (2018) 545–566.
- [132] L. Wang, Y. Li, J.P. Jacquot, N. Rouhier, B. Xia, Characterization of poplar GrxS14 in different structural forms, *Protein Cell* 5 (2014) 329–333.
- [133] X. Liu, S. Liu, Y. Feng, J.Z. Liu, Y. Chen, K. Pham, H. Deng, K.D. Hirschi, X. Wang, N. Cheng, Structural insights into the N-terminal GYI-YIG endonuclease activity of Arabidopsis glutaredoxin AtGRXS16 in chloroplasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 9565–9570.
- [134] F. Zannini, A. Moseler, R. Bchini, T. Dhalleine, A.J. Meyer, N. Rouhier, J. Couturier, The thioredoxin-mediated recycling of Arabidopsis thaliana GRXS16 relies on a conserved C-terminal cysteine, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1863 (2019) 426–436.
- [135] T. Dhalleine, N. Rouhier, J. Couturier, Putative roles of glutaredoxin-BolA heterodimers in plants, *Plant Signal. Behav.* 9 (2014) e28564.
- [136] M.A. Uzarska, J. Przybyla-Toscano, F. Spantgar, F. Zannini, R. Lill, U. Muhlenhoff, N. Rouhier, Conserved functions of Arabidopsis mitochondrial late-acting maturation factors in the trafficking of iron sulfur clusters, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* 1865 (2018) 1250–1259.
- [137] P. Rey, N. Becuwe, S. Tourrette, N. Rouhier, Involvement of Arabidopsis glutaredoxin S14 in the maintenance of chlorophyll content, *Plant Cell Environ.* 40 (2017) 2319–2332.
- [138] J. Knuesting, C. Riondet, C. Maria, I. Kruse, N. Becuwe, N. Konig, C. Berndt, S. Tourrette, J. Guilleminot-Montoya, E. Herrero, F. Gaymard, J. Balk, G. Belli, R. Scheibe, J.P. Reichheld, N. Rouhier, P. Rey, Arabidopsis glutaredoxin S17 and its partner, the nuclear factor Y subunit Cl11/negative cofactor 2alpha, contribute to maintenance of the shoot apical meristem under long-day photoperiod, *Plant Physiol.* 167 (2015) 1643–1658.
- [139] P. Haunhorst, C. Berndt, S. Eitner, J.R. Godoy, C.H. Lillig, Characterization of the human monothiol glutaredoxin 3 (PICOT) as iron-sulfur protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394 (2010) 372–376.
- [140] C.B. Chi, Y. Tang, J. Zhang, Y.N. Dai, M. Abdalla, Y. Chen, C.Z. Zhou, Structural and biochemical insights into the multiple functions of yeast Grx3, *J. Mol. Biol.* 430 (2018) 1235–1248.
- [141] A.K. Jainarayanan, S. Yadav, A.K. Bachhawat, Yeast glutaredoxin, GRX4, functions as a glutathione S-transferase required for red ade pigment formation in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biosci.* 45 (2020).
- [142] U. Muhlenhoff, S. Molik, J.R. Godoy, M.A. Uzarska, N. Richter, A. Seubert, Y. Zhang, J. Stubbe, F. Pierrel, E. Herrero, C.H. Lillig, R. Lill, Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster, *Cell Metab.* 12 (2010) 373–385.
- [143] S. Labbe, M.G. Khan, J.F. Jacques, Iron uptake and regulation in *Schizosaccharomyces pombe*, *Curr. Opin. Microbiol.* 16 (2013) 669–676.
- [144] K.D. Kim, H.J. Kim, K.C. Lee, J.H. Roe, Multi-domain CGFS-type glutaredoxin Grx4 regulates iron homeostasis via direct interaction with a repressor Fep1 in fission yeast, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408 (2011) 609–614.
- [145] M. Misslinger, M.T. Scheven, P. Hortschansky, M.S. Lopez-Berges, K. Heiss, N. Beckmann, T. Heigl, M. Hermant, T. Kruger, O. Kniemeyer, A.A. Brakhage, H. Haas, The monothiol glutaredoxin GrxD is essential for sensing iron starvation in *Aspergillus fumigatus*, *PLoS Genet.* 15 (2019) e1008379.
- [146] N.H. Cheng, W. Zhang, W.Q. Chen, J. Jin, X. Cui, N.F. Butte, L. Chan, K.D. Hirschi, A mammalian monothiol glutaredoxin, Grx3, is critical for cell cycle progression during embryogenesis, *FEBS J.* 278 (2011) 2525–2539.
- [147] P. Haunhorst, E.M. Hanschmann, L. Brautigam, O. Stehling, B. Hoffmann, U. Muhlenhoff, R. Lill, C. Berndt, C.H. Lillig, Crucial function of vertebrate glutaredoxin 3 (PICOT) in iron homeostasis and hemoglobin maturation, *Mol. Biol. Cell* 24 (2013) 1895–1903.
- [148] Y. Zhang, H. Li, C. Zhang, X. An, L. Liu, J. Stubbe, M. Huang, Conserved electron donor complex Dre2-Tah18 is required for ribonucleotide reductase metallocofactor assembly and DNA synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) E1695–E1704.
- [149] S. Inigo, A.N. Durand, A. Ritter, S. Le Gall, M. Termathe, R. Klassen, T. Tohge, B. De Coninck, J. Van Leene, R. De Clercq, B.P. Cammue, A.R. Fernie, K. Gevaert, G. De Jaeger, S.A. Leidel, R. Schaffrath, M. Van Lijsebettens, L. Pauwels, A. Goossens, Glutaredoxin GRXS17 associates with the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway, *Plant Physiol.* 172 (2016) 858–873.
- [150] A.G. Frey, D.J. Palenchar, J.D. Wildemann, C.C. Philpott, A glutaredoxin-BolA complex serves as an iron-sulfur cluster chaperone for the cytosolic cluster assembly machinery, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 22344–22356.
- [151] Y. Saito, H. Shibayama, H. Tanaka, A. Tanimura, I. Matsumura, Y. Kanakura, PICOT is a molecule which binds to anamorsin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408 (2011) 329–333.
- [152] L. Banci, S. Ciofi-Baffoni, K. Gajda, R. Muzzioli, R. Peruzzini, J. Winkelmann, N-terminal domains mediate [2Fe-2S] cluster transfer from glutaredoxin-3 to anamorsin, *Nat. Chem. Biol.* 11 (2015) 772–778.
- [153] D.J. Netz, H.M. Genau, B.D. Weiler, E. Bill, A.J. Pierik, R. Lill, The conserved protein Dre2 uses essential [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters for its function in cytosolic iron-sulfur protein assembly, *Biochem. J.* 473 (2016) 2073–2085.
- [154] A. Hofer, M. Crona, D.T. Logan, B.M. Sjöberg, DNA building blocks: keeping control of manufacture, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 47 (2012) 50–63.
- [155] M. Sommerhalter, W.C. Voegtli, D.L. Perlstein, J. Ge, J. Stubbe, A.C. Rosenzweig, Structures of the yeast ribonucleotide reductase Rnr2 and Rnr4 homodimers, *Biochemistry* 43 (2004) 7736–7742.
- [156] H. Li, M. Stumpfig, C. Zhang, X. An, J. Stubbe, R. Lill, M. Huang, The diferric-tyrosyl radical cluster of ribonucleotide reductase and cytosolic iron-sulfur clusters have distinct and similar biogenesis requirements, *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 11445–11451.
- [157] Y. Zhang, L. Liu, X. Wu, X. An, J. Stubbe, M. Huang, Investigation of in vivo diferric tyrosyl radical formation in *Saccharomyces cerevisiae* Rnr2 protein: requirement of Rnr4 and contribution of Grx3/4 AND Dre2 proteins, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 41499–41509.
- [158] C.E. Outten, Regulation of iron homeostasis in *S. cerevisiae*, in: T. Rouault (Ed.), *Iron-Sulfur Clusters in Chemistry and Biology*, Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston, 2014, pp. 411–436.
- [159] A. Kumanovics, O.S. Chen, L. Li, D. Bagley, E.M. Adkins, H. Lin, N.N. Dingra, C.E. Outten, G. Keller, D. Winge, D.M. Ward, J. Kaplan, Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 10276–10286.
- [160] Z. Cheng, K. Miura, V.L. Popov, Y. Kumagai, Y. Rikihisa, Insights into the CtrA regulon in development of stress resistance in obligatory intracellular pathogen *Ehrlichia chaffeensis*, *Mol. Microbiol.* 82 (2011) 1217–1234.
- [161] J.F. Jacques, A. Mercier, A. Brault, T. Mourer, S. Labbe, Fra2 is a co-regulator of Fep1 inhibition in response to iron starvation, *PLoS One* 9 (2014) e98959.
- [162] A.C. Dlouhy, J. Beaudoin, S. Labbe, C.E. Outten, *Schizosaccharomyces pombe* Grx4 regulates the transcriptional repressor Php4 via [2Fe-2S] cluster binding, *Metalloids* 9 (2017) 1096–1105.
- [163] G. Giannuzzi, P.J. Schmidt, E. Porcu, G. Willemin, K.M. Munson, X. Nuttle, R. Earl,

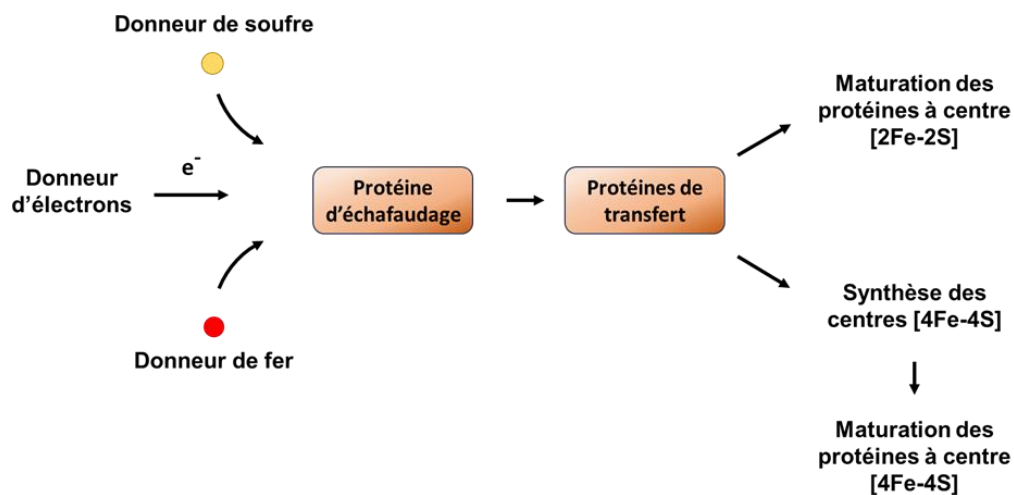
- J. Chrast, K. Hoekzema, D. Risso, K. Mannik, P. De Nittis, E.D. Baratz, C. p, Y. Herault, X. Gao, C.C. Philpott, R.A. Bernier, Z. Kutalik, M.D. Fleming, E.E. Eichler, A. Reymond, The human-specific BOLA2 duplication modifies iron homeostasis and anemia predisposition in chromosome 16p11.2 autism individuals, *Am. J. Hum. Genet.* 105 (2019) 947–958.
- [164] S.J. Patel, A.G. Frey, D.J. Palenchar, S. Achar, K.Z. Bullough, A. Vashisht, J.A. Wohlschlegel, C.C. Philpott, A PCBP1-Bola2 chaperone complex delivers iron for cytosolic [2Fe-2S] cluster assembly, *Nat. Chem. Biol.* 15 (2019) 872–881.
- [165] C.C. Philpott, M.S. Ryu, A. Frey, S. Patel, Cytosolic iron chaperones: proteins delivering iron cofactors in the cytosol of mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 12764–12771.
- [166] X. Wang, X. Chen, L. Sun, W. Qian, Canonical cytosolic iron-sulfur cluster assembly and non-canonical functions of DRE2 in Arabidopsis, *PLoS Genet.* 15 (2019) e1008094.
- [167] D.G. Bernard, D.J. Netz, T.J. Lagny, A.J. Pierik, J. Balk, Requirements of the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway in Arabidopsis, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 368 (2013) 20120259.
- [168] L. Qin, M. Wang, J. Zuo, X. Feng, X. Liang, Z. Wu, H. Ye, Cytosolic Bola plays a repressive role in the tolerance against excess iron and MV-induced oxidative stress in plants, *PLoS One* 10 (2015) e0124887.
- [169] K. Bych, D.J. Netz, G. Vigani, E. Bill, R. Lill, A.J. Pierik, J. Balk, The essential cytosolic iron-sulfur protein NBP35 acts without CFD1 partner in the green lineage, *J. Biol. Chem.* (2008) 35797–35804.
- [170] D. Luo, D.G. Bernard, J. Balk, H. Hai, X. Cui, The DUF59 family gene AE7 acts in the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway to maintain nuclear genome integrity in Arabidopsis, *Plant Cell* 24 (2012) 4135–4148.
- [171] N.H. Cheng, J.Z. Liu, X. Liu, Q. Wu, S.M. Thompson, J. Lin, J. Chang, S.A. Whitham, S. Park, J.D. Cohen, K.D. Hirschi, Arabidopsis monothiol glutaredoxin, AtGRXS17, is critical for temperature-dependent postembryonic growth and development via modulating auxin response, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 20398–20406.
- [172] H. Yu, J. Yang, Y. Shi, J. Donelson, S.M. Thompson, S. Sprague, T. Roshan, D.L. Wang, J. Liu, S. Park, P.A. Nakata, E.L. Connolly, K.D. Hirschi, M.A. Grusak, N. Cheng, Arabidopsis glutaredoxin S17 contributes to vegetative growth, mineral accumulation, and redox balance during iron deficiency, *Front. Plant Sci.* 8 (2017) 1045.
- [173] N. Cheng, H. Yu, X. Rao, S. Park, E.L. Connolly, K.D. Hirschi, P.A. Nakata, Alteration of iron responsive gene expression in Arabidopsis glutaredoxin S17 loss of function plants with or without iron stress, *Plant Signal. Behav.* 15 (2020) 1758455.
- [174] F. Gao, K. Robe, F. Gaymard, E. Izquierdo, C. Dubos, The transcriptional control of iron homeostasis in plants: a tale of bHLH transcription factors? *Front. Plant Sci.* 10 (2019) 6.
- [175] M. Gupta, C.E. Outten, Iron-sulfur cluster signaling: the common thread in fungal iron regulation, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 55 (2020) 189–201.
- [176] M. Misslinger, B.E. Lechner, K. Bacher, H. Haas, Iron-sensing is governed by mitochondrial, not by cytosolic iron-sulfur cluster biogenesis in *Aspergillus fumigatus*, *Metallomics* 10 (2018) 1687–1700.
- [177] Z. Wang, T. Ma, Y. Huang, J. Wang, Y. Chen, H.C. Kistler, Z. Ma, Y. Yin, A fungal ABC transporter FgAtm1 regulates iron homeostasis via the transcription factor cascade FgAreA-HapX, *PLoS Pathog.* 15 (2019) e1007791.
- [178] U. Muhlenhoff, B. Hoffmann, N. Richter, N. Rietzschel, F. Spantgar, O. Stehling, M.A. Uzarska, R. Lill, Compartmentalization of iron between mitochondria and the cytosol and its regulation, *Eur. J. Cell Biol.* 94 (2015) 292–308.
- [179] A. Brault, T. Mourer, S. Labbe, Molecular basis of the regulation of iron homeostasis in fission and filamentous yeasts, *IUBMB Life* 67 (2015) 801–815.
- [180] M. Misslinger, P. Hortschansky, A.A. Brakhage, H. Haas, Fungal iron homeostasis with a focus on *Aspergillus fumigatus*, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* (2020) (in press).
- [181] M.T. Martinez-Pastor, R. de Llanos, A.M. Romero, S. Puig, Post-transcriptional regulation of iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 15785–15809.
- [182] R. Ueta, N. Fujiwara, K. Iwai, Y. Yamaguchi-Iwai, Iron-induced dissociation of the Aft1p transcriptional regulator from target gene promoters is an initial event in iron-dependent gene suppression, *Mol. Cell Biol.* 32 (2012) 4998–5008.
- [183] H. Li, C.E. Outten, The conserved CDC motif in the yeast iron regulator Aft2 mediates iron-sulfur cluster exchange and protein-protein interactions with Grx3 and Bol2, *J. Biol. Inorg. Chem.* 24 (2019) 809–815.
- [184] H.J. Kim, K.L. Lee, K.D. Kim, J.H. Roe, The iron uptake repressor Fep1 in the fission yeast binds Fe-S cluster through conserved cysteines, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478 (2016) 187–192.
- [185] M.G. Khan, J.F. Jacques, J. Beaudoin, S. Labbe, Characterization of the nuclear import mechanism of the CCAAT-regulatory subunit Pph4, *PLoS One* 9 (2014) e110721.
- [186] M. Schrettl, H. Haas, Iron homeostasis-Achilles' heel of *Aspergillus fumigatus*? *Curr. Opin. Microbiol.* 14 (2011) 400–405.
- [187] R. Attarian, G. Hu, E. Sanchez-Leon, M. Caza, D. Croll, E. Do, H. Bach, T. Missall, J. Lodge, W.H. Jung, J.W. Kronstad, The monothiol glutaredoxin Grx4 regulates iron homeostasis and virulence in *Cryptococcus neoformans*, *mBio* 9 (2018).
- [188] M. Jbel, A. Mercier, S. Labbe, Grx4 monothiol glutaredoxin is required for iron limitation-dependent inhibition of Fep1, *Eukaryot. Cell* 10 (2011) 629–645.
- [189] A. Mercier, S. Labbe, Both Pph4 function and subcellular localization are regulated by iron via a multistep mechanism involving the glutaredoxin Grx4 and the exportin Crm1, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 20249–20262.
- [190] P. Vachon, A. Mercier, M. Jbel, S. Labbe, The monothiol glutaredoxin Grx4 exerts an iron-dependent inhibitory effect on Pph4 function, *Eukaryot. Cell* 11 (2012) 806–819.
- [191] J. Encinar del Dedo, N. Gabrielli, M. Carmona, J. Ayte, E. Hidalgo, A cascade of iron-containing proteins governs the genetic iron starvation response to promote iron uptake and inhibit iron storage in fission yeast, *PLoS Genet.* 11 (2015) e1005106.
- [192] M. Patti, A. Cutone, G. Musci, Mutational analysis of the cysteine-rich region of the iron-responsive GATA factor Fep1. Role of individual cysteines as [2Fe-2S] cluster ligands, *Cell Biochem. Biophys.* 76 (2018) 339–344.
- [193] A. Cutone, B.D. Howes, A.E. Miele, R. Miele, A. Giorgi, A. Battistoni, G. Smulevich, G. Musci, M.C. di Patti, *Pichia pastoris* Fep1 is a [2Fe-2S] protein with a Zn finger that displays an unusual oxygen-dependent role in cluster binding, *Sci. Rep.* 6 (2016) 31872.
- [194] K.A. Harrison, G.A. Marzluf, Characterization of DNA binding and the cysteine rich region of SRE, a GATA factor in *Neurospora crassa* involved in siderophore synthesis, *Biochemistry* 41 (2002) 15288–15295.
- [195] L.Y. Chao, M.A. Marletta, J. Rine, Sre1, an iron-modulated GATA DNA-binding protein of iron-uptake genes in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*, *Biochemistry* 47 (2008) 7274–7283.
- [196] M. Lundberg, C. Johansson, J. Chandra, M. Enoksson, G. Jacobsson, J. Ljung, M. Johansson, A. Holmgren, Cloning and expression of a novel human glutaredoxin (Grx2) with mitochondrial and nuclear isoforms, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 26269–26275.
- [197] V.N. Gladyshev, A. Liu, S.V. Novoselov, K. Krysan, Q.A. Sun, V.M. Kryukov, G.V. Kryukov, M.F. Lou, Identification and characterization of a new mammalian glutaredoxin (thioltransferase), Grx2, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 30374–30380.
- [198] M.E. Lonn, C. Hudemann, C. Berndt, V. Cherkasov, F. Capani, A. Holmgren, C.H. Lillig, Expression pattern of human glutaredoxin 2 isoforms: identification and characterization of two testis/cancer cell-specific isoforms, *Antioxid. Redox Signal.* 10 (2008) 547–557.
- [199] C. Hudemann, M.E. Lonn, J.R. Godoy, F. Zahedi Avval, F. Capani, A. Holmgren, C.H. Lillig, Identification, expression pattern, and characterization of mouse glutaredoxin 2 isoforms, *Antioxid. Redox Signal.* 11 (2009) 1–14.
- [200] L. Brautigam, L.D. Schutte, J.R. Godoy, T. Prozorovski, M. Gellert, G. Hauptmann, A. Holmgren, C.H. Lillig, C. Berndt, Vertebrate-specific glutaredoxin is essential for brain development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 20532–20537.
- [201] L. Brautigam, L.D. Jensen, G. Poschmann, S. Nystrom, S. Bannenberg, K. Dreij, K. Lepka, T. Prozorovski, S.J. Montano, O. Aktas, P. Uhlen, K. Stuhler, Y. Cao, A. Holmgren, C. Berndt, Glutaredoxin regulates vascular development by reversible glutathionylation of sirtuin 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 20057–20062.
- [202] C. Berndt, G. Poschmann, K. Stuhler, A. Holmgren, L. Brautigam, Zebrafish heart development is regulated via glutaredoxin 2 dependent migration and survival of neural crest cells, *Redox Biol.* 2 (2014) 673–678.
- [203] K.G. Hoff, R. Goodlitt, R. Li, C.D. Smolke, J.J. Silberg, Fluorescence detection of a protein-bound 2Fe2S cluster, *Chembiochem* 10 (2009) 667–670.
- [204] D.W. Lee, D. Kaur, S.J. Chinta, S. Rajagopalan, J.K. Andersen, A disruption in iron-sulfur center biogenesis via inhibition of mitochondrial dithiol glutaredoxin 2 may contribute to mitochondrial and cellular iron dysregulation in mammalian glutathione-depleted dopaminergic cells: implications for Parkinson's disease, *Antioxid. Redox Signal.* 11 (2009) 2083–2094.
- [205] V. Scalcon, F. Tonolo, A. Folda, A. Bindoli, M.P. Rigobello, Dimers of glutaredoxin 2 as mitochondrial redox sensors in selenite-induced oxidative stress, *Metallomics* 11 (2019) 1241–1251.
- [206] G. Liu, S. Guo, G.J. Anderson, C. Camaschella, B. Han, G. Nie, Heterozygous missense mutations in the GLRX5 gene cause sideroblastic anemia in a Chinese patient, *Blood* 124 (2014) 2750–2751.
- [207] R. Daher, A. Mansouri, A. Martelli, S. Bayart, H. Manceau, I. Callebaut, B. Moulouel, L. Gouya, H. Puy, C. Kannengieser, Z. Karim, GLRX5 mutations impair heme biosynthetic enzymes ALA synthase 2 and ferrochelatase in human congenital sideroblastic anemia, *Mol. Genet. Metab.* 128 (2019) 342–351.
- [208] Z.N. Al-Hassnan, M. Al-Dosary, M. AlFadhel, E.A. Faqieh, M. Alsagob, R. Kenana, R. Almaseh, O.S. Al-Harazi, H. Al-Hindi, O.I. Malibari, F.B. Almutari, S. Tulbah, F. Alhadeq, T. Al-Sheddi, R. Alamro, A. AlAsmari, M. Almutashri, H. Alshaalan, F.A. Al-Mohanna, D. Colak, N. Kaya, ISCA2 mutation causes infantile neurodegenerative mitochondrial disorder, *J. Med. Genet.* 52 (2015) 186–194.
- [209] A. Torracca, O. Stehling, C. Stumpffig, R. Rosser, D. De Rasmio, G. Fiermonte, D. Verrigni, T. Rizza, A. Voza, M. Di Nottia, D. Diodato, D. Martinelli, F. Piemonte, C. Dionisi-Vici, E. Bertini, R. Lill, R. Carrozzo, ISCA1 mutation in a patient with infantile-onset leukodystrophy causes defects in mitochondrial [4Fe-4S] proteins, *Hum. Mol. Genet.* 27 (2018) 2739–2754.
- [210] G. Liu, Y. Wang, G.J. Anderson, C. Camaschella, Y. Chang, G. Nie, Functional analysis of GLRX5 mutants reveals distinct functionalities of GLRX5 protein, *J. Cell. Biochem.* 117 (2016) 207–217.
- [211] Q. Yu, Y.Y. Tai, Y. Tang, J. Zhao, V. Negi, M.K. Culley, J. Pilli, W. Sun, K. Brugger, J. Mayr, R. Saggat, R. Saggat, W.D. Wallace, D.J. Ross, A.B. Waxman, S.G. Wendell, S.J. Mullett, J. Sembrat, M. Rojas, O.F. Khan, J.E. Dahlman, M. Sugahara, N. Kagiya, T. Satoh, M. Zhang, N. Feng, J. Gorsan 3rd, S.O. Vargas, K.J. Haley, R. Kumar, B.B. Graham, R. Langer, D.G. Anderson, B. Wang, S. Shiva, T. Bertero, S.Y. Chan, BOLA (BOLA Family Member 3) deficiency controls endothelial metabolism and glycine homeostasis in pulmonary hypertension, *Circulation* 139 (2019) 2238–2255.
- [212] S.F. Petry, F. Sharifpanah, H. Sauer, T. Linn, Differential expression of islet glutaredoxin 1 and 5 with high reactive oxygen species production in a mouse model of diabetes, *PLoS One* 12 (2017) e0176267.
- [213] S.F. Petry, L.M. Sun, A. Knapp, S. Reinl, T. Linn, Distinct shift in beta-cell glutaredoxin 5 expression is mediated by hypoxia and lipotoxicity both in vivo and in

- vitro, *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 9 (2018) 84.
- [214] T.J. LaRocca, T. Seeger, M. Prado, I. Perea-Gil, E. Neofytou, B.H. Mecham, M. Ameen, A.C.Y. Chang, G. Pandey, J.C. Wu, I. Karakikes, Pharmacological silencing of MicroRNA-152 prevents pressure overload-induced heart failure, *Circ. Heart Fail.* 13 (2020) e006298.
- [215] L. Chen, H. Qian, J. Xue, J. Zhang, H. Chen, MicroRNA152 regulates insulin secretion and pancreatic beta cell proliferation by targeting PI3Kalpha, *Mol. Med. Rep.* 18 (2018) 4113–4121.
- [216] J. Guo, J. Du, D. Fei, J. Xing, J. Liu, H. Lu, miR152 inhibits rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation and induces apoptosis by targeting ADAM10, *Int. J. Mol. Med.* 42 (2018) 643–650.
- [217] L.W. Li, H.Q. Xiao, R. Ma, M. Yang, W. Li, G. Lou, miR-152 is involved in the proliferation and metastasis of ovarian cancer through repression of ERBB3, *Int. J. Mol. Med.* 41 (2018) 1529–1535.
- [218] H. Zhang, D. Qi, J. Li, T. Peng, L. Yang, J. Yuan, Y. Zhang, Y. Hu, J. Su, B. Que, M. Li, G. Zhou, Y. Chen, W. Zhang, W. Ji, A novel regulatory circuit of miR152 and DNMT1 in human bladder cancer, *Oncol. Rep.* 40 (2018) 1803–1812.
- [219] D. Jeong, H. Cha, E. Kim, M. Kang, D.K. Yang, J.M. Kim, P.O. Yoon, J.G. Oh, O.Y. Bernecker, S. Sakata, T.T. Le, L. Cui, Y.H. Lee, H. Kim Do, S.H. Woo, R. Liao, R.J. Hajjar, W.J. Park, PICOT inhibits cardiac hypertrophy and enhances ventricular function and cardiomyocyte contractility, *Circ. Res.* 99 (2006) 307–314.
- [220] D. Jeong, J.M. Kim, H. Cha, J.G. Oh, J. Park, S.H. Yun, E.S. Ju, E.S. Jeon, R.J. Hajjar, W.J. Park, PICOT attenuates cardiac hypertrophy by disrupting calcineurin-NFAT signaling, *Circ. Res.* 102 (2008) 711–719.
- [221] J.G. Oh, D. Jeong, H. Cha, J.M. Kim, E. Lifirsu, J. Kim, D.K. Yang, C.S. Park, C. Kho, S. Park, Y.J. Yoo, D.H. Kim, J. Kim, R.J. Hajjar, W.J. Park, PICOT increases cardiac contractility by inhibiting PKCzeta activity, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 53 (2012) 53–63.
- [222] J. Kim, J. Kim, H. Kook, W.J. Park, PICOT alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by reducing intracellular levels of reactive oxygen species, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 485 (2017) 807–813.
- [223] M. Gellert, E. Richter, J. Mostertz, L. Kantz, K. Masur, E.M. Hanschmann, S. Ribback, N. Kroeger, E. Schaeffeler, S. Winter, F. Hochgrafe, M. Schwab, C.H. Lillig, The cytosolic isoform of glutaredoxin 2 promotes cell migration and invasion, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2020 (1864) 129599.
- [224] A. Young, D. Gardiner, N. Kuksal, R. Gill, M. O'Brien, R.J. Mailloux, Deletion of the glutaredoxin-2 gene protects mice from diet-induced weight gain, which correlates with increased mitochondrial respiration and proton leaks in skeletal muscle, *Antioxid. Redox Signal.* 31 (2019) 1272–1288.
- [225] Z. Wohua, X. Weiming, Glutaredoxin 2 (GRX2) deficiency exacerbates high fat diet (HFD)-induced insulin resistance, inflammation and mitochondrial dysfunction in brain injury: a mechanism involving GSK-3beta, *Biomed. Pharmacother.* 118 (2019) 108940.
- [226] K. Lepka, K. Volbracht, E. Bill, R. Schneider, N. Rios, T. Hildebrandt, J. Ingwersen, T. Prozorovski, C.H. Lillig, J. van Horssen, L. Steinman, H.P. Hartung, R. Radi, A. Holmgren, O. Aktas, C. Berndt, Iron-sulfur glutaredoxin 2 protects oligodendrocytes against damage induced by nitric oxide release from activated microglia, *Glia* 65 (2017) 1521–1534.



### 3. La machinerie ISC d'assemblage des centres Fe-S mitochondriale

Les centres Fe-S ne sont pas présents au sein des protéines dès leur synthèse, leur incorporation est une modification post-traductionnelle opérée après leur acheminement au sein de leur compartiment subcellulaire. Ainsi chez les plantes, la biogénèse des centres Fe-S et la maturation de protéines cibles fait intervenir plusieurs réseaux moléculaires complexes appelés machineries. Ces dernières sont présentes au sein du cytosol (machinerie CIA), de la mitochondrie (machinerie ISC) et du chloroplaste (machinerie SUF) et permettent respectivement la maturation des protéines cytosoliques et nucléaires, mitochondriales et enfin chloroplastiques. Leur fonctionnement est similaire et repose sur deux étapes majeures. Dans un premier temps, un centre [2Fe-2S] est synthétisé sur le/les protéines d'échafaudage(s) grâce à un apport de fer, de soufre et d'électrons. Par la suite, ce centre Fe-S est acheminé jusqu'aux protéines cibles par l'action d'une ou plusieurs protéines de transfert. C'est également au cours de cette étape que la biogénèse des centres [4Fe-4S] a lieu par couplage réductif de deux centres [2Fe-2S] grâce à un apport d'électrons (figure 9).



**Figure 9. Représentation schématique du fonctionnement des machineries d'assemblage des centres Fe-S**

Pour cette section, j'ai intégré un article de synthèse sur ce sujet et pour lequel je suis co-auteur. Depuis la rédaction de cette revue, quelques informations nouvelles ont été obtenues concernant la formation de centres [2Fe-2S] et les étapes tardives (*i.e.* la formation et le transfert des centres [4Fe-4S]) de la machinerie ISC et seront présentées dans un second temps.

REVIEW PAPER

# Iron–sulfur proteins in plant mitochondria: roles and maturation

Jonathan Przybyla-Toscano<sup>1,2</sup>, Loïck Christ<sup>1</sup>, Olivier Keech<sup>2</sup> and Nicolas Rouhier<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Lorraine, INRAE, IAM, F-54000 Nancy, France

<sup>2</sup> Department of Plant Physiology, Umeå Plant Science Centre, Umeå University, S-90187 Umeå, Sweden

\* Correspondence: [Nicolas.Rouhier@univ-lorraine.fr](mailto:Nicolas.Rouhier@univ-lorraine.fr)

Received 7 August 2020; Editorial decision 2 December 2020; Accepted 5 December 2020

Editor: Karl-Josef Dietz, Bielefeld University, Germany

## Abstract

**Iron–sulfur (Fe–S) clusters are prosthetic groups ensuring electron transfer reactions, activating substrates for catalytic reactions, providing sulfur atoms for the biosynthesis of vitamins or other cofactors, or having protein-stabilizing effects. Hence, metalloproteins containing these cofactors are essential for numerous and diverse metabolic pathways and cellular processes occurring in the cytoplasm. Mitochondria are organelles where the Fe–S cluster demand is high, notably because the activity of the respiratory chain complexes I, II, and III relies on the correct assembly and functioning of Fe–S proteins. Several other proteins or complexes present in the matrix require Fe–S clusters as well, or depend either on Fe–S proteins such as ferredoxins or on cofactors such as lipoic acid or biotin whose synthesis relies on Fe–S proteins. In this review, we have listed and discussed the Fe–S-dependent enzymes or pathways in plant mitochondria including some potentially novel Fe–S proteins identified based on *in silico* analysis or on recent evidence obtained in non-plant organisms. We also provide information about recent developments concerning the molecular mechanisms involved in Fe–S cluster synthesis and trafficking steps of these cofactors from maturation factors to client apoproteins.**

**Keywords:** Biogenesis, electron transfer, enzyme catalysis, iron–sulfur proteins, mitochondria, photosynthetic organisms, respiratory complexes.

## Introduction

Plant mitochondria are spherical to rod-shaped organelles with a diameter ranging from 0.2  $\mu\text{m}$  to 2  $\mu\text{m}$  (Logan, 2006). They are considered as semi-autonomous organelles because of their own genome and protein synthesis machinery (Mackenzie and McIntosh, 1999). The size and structure of plant mitogenomes are quite diverse owing to fusion/fission, homologous recombination, and horizontal gene transfer events (Warren and Sloan,

2020). Only an infinitesimal fraction of the mitochondrial proteome is encoded by the mitochondrial genome (i.e. <1%) and, in all species, the vast majority of mitochondrial polypeptides are encoded by the nuclear genome, synthesized in the cytosol, and translocated in mitochondria using a mitochondrial targeting sequence (MTS). In Arabidopsis, the average number of protein molecules per single mitochondrion has

recently been estimated at 1.4 million, distributed in ~2900 different protein types (Fuchs *et al.*, 2020). As for chloroplasts (Przybyla-Toscano *et al.*, 2018), the demand for iron–sulfur (Fe–S) clusters in mitochondria is high. By fulfilling essential functions in electron transport, enzyme catalysis, or sulfur donation, Fe–S clusters ensure the functionality of many vital processes, such as respiration or the biosynthesis of some vitamins and cofactors for instance. In eukaryotes, Fe–S clusters exist mostly under three forms depending on the number of iron and sulfur atoms, with the [4Fe–4S] and [2Fe–2S] cluster types being predominant over the [3Fe–4S] cluster type. In mitochondria, the biogenesis of these metallic cofactors depends on the iron–sulfur cluster (ISC) assembly machinery. By exporting a sulfur moiety, the ISC machinery is also required for the functioning of the cytosolic iron–sulfur protein assembly (CIA) machinery and thus for the maturation of the associated cytosolic and nuclear Fe–S proteins. For these aspects, we direct the readers to the reviews by Paul and Lill (2015) and Lill (2020). In this review, we will only describe the mitochondrial processes that depend on Fe–S proteins and detail how these metallic cofactors are assembled, focusing on photosynthetic organisms, and *Arabidopsis thaliana* in particular. We also discuss whether recently identified molecular features that guide the specific recognition of Fe–S client proteins by maturation factors are conserved in plants.

## Overview of the diversity of Fe–S protein-dependent pathways in mitochondria from photosynthetic organisms

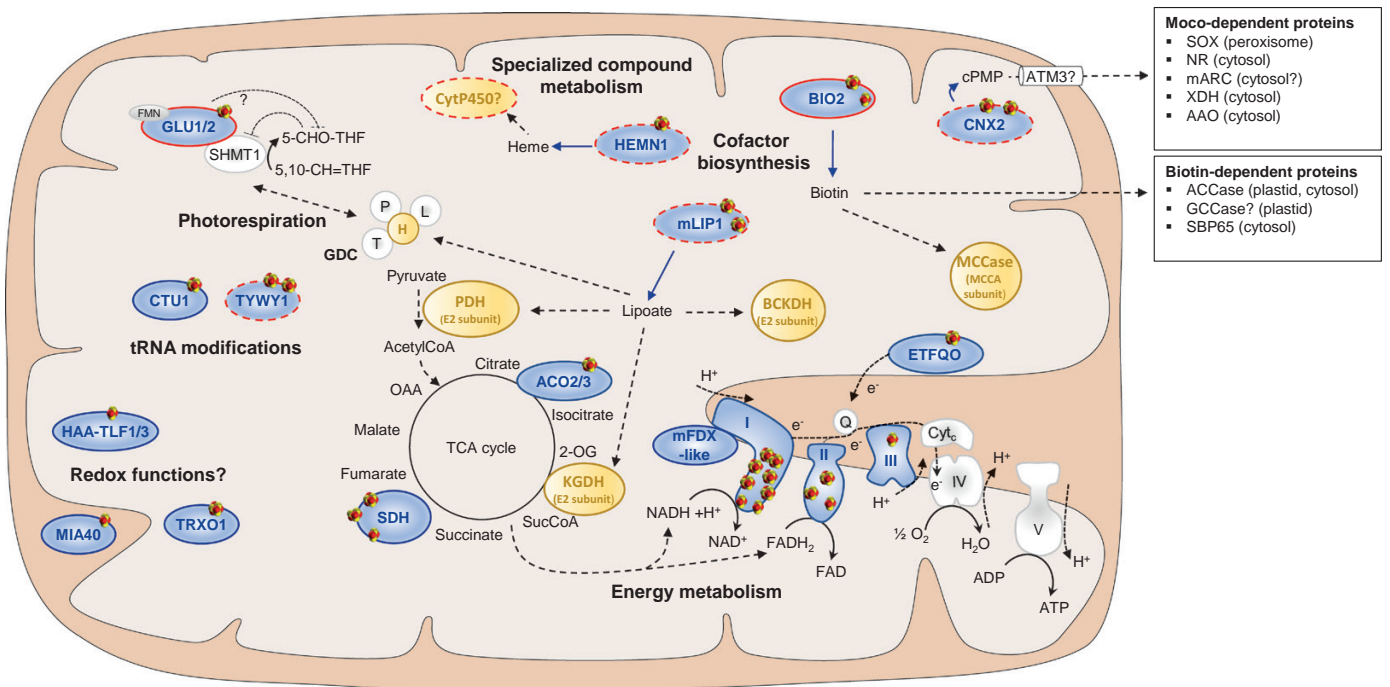
### *Fe–S clusters in respiration*

Among other functions, mitochondria have a pivotal role in cellular energy production. In photoautotrophic tissues under light conditions, mitochondria ensure this function by working in concert with chloroplasts (Gardeström and Igamberdiev, 2016). Yet, in heterotrophic tissues, in the absence of light (Lee *et al.*, 2011) or at specific developmental stages such as leaf senescence (Keech *et al.*, 2007; Chrobok *et al.*, 2016), mitochondria are the primary sites for energy production. Energy is synthesized in the form of ATP, which in mitochondria is produced mostly through the oxidative phosphorylation of reducing equivalents. Although the most canonical pathway integrates the oxidation of sugars via glycolysis and the subsequent decarboxylation of pyruvate by the tricarboxylic acid (TCA) cycle, many other alternative substrates and thus entry points exist (Hildebrandt *et al.*, 2015). This is exemplified, for instance, by the oxidation of certain amino acids under starvation conditions (Ishizaki *et al.*, 2005; Araújo *et al.*, 2011c) or senescence (Chrobok *et al.*, 2016). Regardless of the substrates oxidized, the general process at the mitochondrial electron transport chain (mETC) aims at building an electrochemical gradient of protons across the inner membrane, which in turn

powers the ATP synthase and allows the phosphorylation of ADP to ATP in the matrix. Fe–S proteins are involved at several steps of this system (Fig. 1).

### *The tricarboxylic acid cycle*

Aconitase (ACO) is a [4Fe–4S] enzyme that catalyzes the reversible isomerization of citrate to isocitrate. In this reaction, a vacant (i.e. not coordinated to the protein) iron atom of the Fe–S cluster acts as a Lewis acid, allowing the binding of the C-3 carboxyl and hydroxyl groups of citrate and its activation (Flint and Allen, 1996). In angiosperms, gene duplication events contributed to the expansion of the ACO family, and three isoforms distributed between mitochondria (i.e. ACO2/3) and the cytosol (i.e. ACO1/3) have been reported in *Arabidopsis* (Table 1) and their transcript expression in *Arabidopsis* organs and transcript stability differ substantially (Fig. 2) (Arnaud *et al.*, 2007; Y.M. Wang *et al.*, 2016). This provides angiosperms with an accrued metabolic flexibility as ACOs also participate in the carbon skeleton flow of lipid metabolism, sucrose metabolism, as well as the glyoxylate cycle in the cytosol of plants (Hooks *et al.*, 2014). While *Arabidopsis* mutants for individual ACO genes have no visible phenotype when plants are grown in standard conditions, a double mutation in ACO1 and ACO3 is lethal, pointing to a certain functional redundancy and central roles for plant metabolism (Table 2) (Arnaud *et al.*, 2007; Moeder *et al.*, 2007). Another protein requiring Fe–S clusters as cofactors and involved in the TCA cycle is succinate dehydrogenase (SDH). This enzyme, which is also associated with the mETC and referred to as complex II (cf, below), catalyzes the oxidation of succinate to fumarate while concomitantly reducing FAD into FADH<sub>2</sub> (Huang *et al.*, 2019). SDH is structurally conserved in prokaryotes and eukaryotes, and consists of four subunits (SDH1–SDH4). The SDH1 subunit binds both an FAD and a heme, SDH2 harbors three Fe–S clusters (1× [2Fe–2S], 1×[3Fe–4S], 1× [4Fe–4S]), whereas SDH3 and SDH4 subunits form a membrane domain mediating the anchoring of this multiprotein complex to the mitochondrial inner membrane. A larger SDH complex is found in plants because of the presence of four extra accessory subunits, designated SDH5–SDH8 (Schikowsky *et al.*, 2017). In *Arabidopsis*, the SDH2 subunit is encoded by three genes (*SDH2-1–SDH2-3*) with specific expression territories, whereas there is often a single gene in other organisms. The *SDH2-3* gene seems to be quite specifically expressed in seeds (Fig. 2) (Restovic *et al.*, 2017). Single mutants are viable, but a *sdh2-1 sdh2-2* mutant is embryo-lethal (Table 2) (Elorza *et al.*, 2004). Intriguingly though, it was reported that antisense inhibition of SDH2 in the mesophyll cells of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) enhances photosynthesis and biomass production (Araújo *et al.*, 2011b). Although the molecular mechanism remains unclear, it certainly highlights the central role of this enzyme in primary metabolism and suggests that a tight regulation of its assembly is needed.



**Fig. 1.** Fe-S protein-dependent metabolic processes in plant mitochondria. Known or predicted Fe-S proteins are represented in blue, surrounded by a red circle when a ferredoxin (FDX) dependency has been proven (full lines) or hypothesized (broken lines). Additional proteins listed as ‘uncertain’ in Table 1 have not been included to avoid too much speculation at this stage. It is also worth saying that (i) an Fe-S cluster was not represented for mFDX-like because of the absence of evidence and the fact that at least one Fe-S cluster binding Cys is absent and (ii) the physiological relevance of Fe-S cluster binding by MIA40 and TRXO1 observed *in vitro* is unknown. Proteins in ochre use cofactors requiring an Fe-S enzyme for their synthesis, either heme, lipoic acid, or biotin. Concerning hemoproteins, only the presence of putative cytochrome P450 monooxygenases has been mentioned as they may be dependent on FDX but not all other known mitochondrial hemoproteins because this is beyond the scope of this review. For enzyme complex subunits or non Fe-S proteins (left white), there are sometimes several isoforms which have not been distinguished. The nomenclature used is that of *A. thaliana*. Abbreviations for all enzyme names can be found in the text. Other abbreviations are: OAA, oxaloacetic acid; 2-OG, 2-oxoglutarate; SucCoA, succinyl-CoA; 5-CHO-THF, 5-formyl-tetrahydrofolate; 5,10-CH=THF, 5,10-methenyl-tetrahydrofolate.

*The mitochondrial electron transport chain*

In most plants, the respiratory chain is composed of four multiprotein complexes, complex I or NADH:ubiquinone oxidoreductase; complex II or succinate:ubiquinone oxidoreductase (also called SDH as mentioned earlier); complex III or ubiquinol:ferricytochrome *c* oxidoreductase; and complex IV or cytochrome *c* oxidase. However, some species, such as the obligate hemiparasitic plant European mistletoe (*Viscum album*), lack complex I (Maclean *et al.*, 2018; Senkler *et al.*, 2018). Fe-S clusters are present in the respiratory complexes I, II, and III. In complex I, eight Fe-S clusters are bound by subunits localized in the matrix arm, the 24 kDa subunit binds one [2Fe-2S] cluster, PSST and 51 kDa subunits bind one [4Fe-4S] cluster, TYKY (NDUFS8.1/NDUFS8.2) binds two [4Fe-4S] clusters, and the 75 kDa subunit binds one [2Fe-2S] cluster and two [4Fe-4S] clusters (Fig. 1) (Hirst and Roessler, 2016; Maldonado *et al.*, 2020). Interestingly, the transcript expression pattern, the protein copies per mitochondrion, as well as the protein half-life do not substantially differ from each other as compared with the other proteins (Fig. 2). Still, it was reported that matrix arm subunits have a higher turnover rate than membrane-associated complex I subunits (Huang *et al.*,

2020). As the most abundant Fe-S proteins in mitochondria together with ACO (Fig. 2), these complex I subunits clearly represent the major sink of iron in this organelle.

As already discussed above, three Fe-S clusters are incorporated into SDH, whereas a unique Rieske-type [2Fe-2S] cluster bound to Rieske protein, RISP, is present in complex III. RISP was recently reported as being part of the mitochondrial contact site and cristae organizing system (MICOS) (Li *et al.*, 2019). The consequences of the disruption of RISP genes have not been described in plants to date (Table 2). However, a recent study demonstrated that a default in RISP translocation during complex III biogenesis leads to embryo lethality in Arabidopsis (Schäfer *et al.*, 2020). Finally, an additional Fe-S enzyme associated with the mETC has to be considered. The electron-transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase (ETFQO) is a [4Fe-4S] enzyme that accepts electrons from several flavoprotein dehydrogenases present in the matrix and transfers them to ubiquinone (Fig. 1) (Araújo *et al.*, 2011c). This protein was demonstrated to be particularly important under carbon starvation, as occurs for instance in response to prolonged darkness (Ishizaki *et al.*, 2005, 2006; Araújo *et al.*, 2010, 2011a). Indeed, Arabidopsis *etfqo* knockout mutants have no phenotype when

**Table 1.** List of mitochondrial ISC maturation factors and confirmed or putative Fe-S proteins from *Arabidopsis thaliana* and evidence for their subcellular localization

Locus ID	Gene name	Description	Mitochondrial Fe-S targets					
			Cofactor(s)	Predictions (Subacon)	Subcellular localization			
					GFP fusion, immunodetection	Experimental data	Other proteomic evidence	References
At1g16700	TYKY	NADH:ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 8.1	2x [4Fe-4S]	Mitochondrion	-	•		
At1g79010	TYKY isoform	NADH:ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 8.2	2x [4Fe-4S]	Mitochondrion	-	•••		
At5g11770	PSST (20-kDa)	NADH-ubiquinone oxidoreductase 20 kDa subunit	[4Fe-4S]	Mitochondrion	-	•••		
At4g02580	24-kDa	NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kDa subunit	[2Fe-2S], Zn	Mitochondrion	Mitochondrion (Peters <i>et al.</i> , 2012)	•••		
At5g08530	51-kDa	51 kDa subunit of complex I	[4Fe-4S], FMN	Mitochondrion	-	•••		
At5g37510	75-kDa	NADH-ubiquinone dehydrogenase	[2Fe-2S], 2x [4Fe-4S]	Mitochondrion	-	•••		
At3g27380	SDH2-1	Succinate dehydrogenase 2-1	[2Fe-2S], [3Fe-4S], [4Fe-4S]	Mitochondrion	Mitochondrion (Figuerao <i>et al.</i> , 2001)	•		
At5g40650	SDH2-2	Succinate dehydrogenase 2-2	[2Fe-2S], [3Fe-4S]	Mitochondrion	Mitochondrion (Figuerao <i>et al.</i> , 2001)	•••		
At5g65165	SDH2-3	Succinate dehydrogenase 2-3	[2Fe-2S], [3Fe-4S], [4Fe-4S]	Mitochondrion	Mitochondrion (Figuerao <i>et al.</i> , 2001)	•••		
At5g13430	RISP/UCR1	Ubiquinol-cytochrome c reductase Fe-S subunit	Rieske [2Fe-2S]	Mitochondrion	-	•••		
At5g13440	RISP/UCR1-like	Ubiquinol-cytochrome c reductase Fe-S subunit	Rieske [2Fe-2S]	Mitochondrion	-	•		
At2g43400	ETFQO	Electron-transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase	[4Fe-4S], FAD	Mitochondrion	Mitochondrion (Ishizaki <i>et al.</i> , 2005)	•••		
At2g43360	BIO2	Biotin synthase	[2Fe-2S], [4Fe-4S]	Mitochondrion	Mitochondrion (Baldet <i>et al.</i> , 1997)	•••		
At2g20860	mLIP1	Mitochondrial lipoic acid synthase 1	2x [4Fe-4S]	Mitochondrion	Mitochondrion (Yasuno and Wada, 1998)	•••		
At2g31955	CNX2	Cofactor of nitrate reductase and xanthine dehydrogenase 2	2x [4Fe-4S]	Mitochondrion	Mitochondrion (Teschner <i>et al.</i> , 2010)	•••		
At5g63290	HEMN1	Radical SAM superfamily protein	[4Fe-4S]	Plastid	Mitochondrion (Pratibha <i>et al.</i> , 2017)	•••		Mitochondrion (Fuchs <i>et al.</i> , 2020)
At4g26970	ACO2	Aconitase 2	[4Fe-4S]	Mitochondrion	Mitochondrion (Arnaud <i>et al.</i> , 2007; Bernard <i>et al.</i> , 2009; Hooks <i>et al.</i> , 2014)	•••		

Table 1. Continued

Mitochondrial Fe-S targets								
Locus ID	Gene name	Description	Cofactor(s)	Predictions (Subaon)	Subcellular localization			
					GFP fusion, immunodetection	Mitoproteome, mitocomplexome	Other proteomic evidence	
				Experimental data		References		
				Niehaus <i>et al.</i> (2020)	Senkler <i>et al.</i> (2017)			
At2g05710	ACO3	Aconitase 3	[4Fe-4S]	Mitochondrion	Cytosol, mitochondrion (Arnaud <i>et al.</i> , 2007; Bernard <i>et al.</i> , 2009; Hooks <i>et al.</i> , 2014)	•••	•	
At3g07480	mFDX-like	Ferredoxin-like superfamily protein	[2Fe-2S] ?	Mitochondrion	Mitochondrion (Carrie <i>et al.</i> , 2009)	•••	•	
At5g23395	MIA40	Mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40 homolog	[2Fe-2S]	Peroxisome	Mitochondrion, peroxisome (Carrie <i>et al.</i> , 2010)	•	•	
At2g35010	TRXO1	Thioredoxin o1	[4Fe-4S]	Mitochondrion	Mitochondrion (Labi <i>et al.</i> , 2001)	•••	•	
At5g04140	GLU1	Glutamate synthase 1	[3Fe-4S], FMN	Plastid	Plastid, mitochondrion (Jamai <i>et al.</i> , 2009)	•	•	
At2g41220	GLU2	Glutamate synthase 2	[3Fe-4S], FMN	Plastid	-		•	
At3g27570	HAA-TLF1	Thioredoxin-like ferredoxin	[2Fe-2S]	Mitochondrion	-		•	
At4g26620	HAA-TLF3	Thioredoxin-like ferredoxin	[2Fe-2S]	Nucleus	-		•	
At2g44270	CTU1/ROL5	Cytoplasmic tRNA 2-thiolation protein 1	[4Fe-4S]	Mitochondrion	Mitochondrion (Leiber <i>et al.</i> , 2010)		•	
At1g75200	TYW1	Flavodoxin family protein/radical SAM domain-containing protein	2x [4Fe-4S], FMN	Mitochondrion	-		•	Mito-chondrion (Finkemeier <i>et al.</i> , 2011)
<b>Uncertain localization</b>								
At1g31020	TRXO2	Thioredoxin o2	[4Fe-4S]	Plastid	-		•	Mitochondrion (Fuchs <i>et al.</i> , 2020)
At4g36390	MIAB	Methylthiotransferase	2x [4Fe-4S]	Plastid	-			
At1g60230	RLMN-like	Radical SAM superfamily protein, RlmN-like	[4Fe-4S]	Plastid	-			
At2g39670	RLMN-like	Radical SAM superfamily protein, RlmN-like	[4Fe-4S]	Plastid	-			Mitochondrion (Fuchs <i>et al.</i> , 2020)
At3g21300	TRM2A	RNA methyltransferase	[4Fe-4S]	Mitochondrion	-			Mitochondrion (Fuchs <i>et al.</i> , 2020)

Table 1. Continued

Mitochondrial Fe–S targets						
Locus ID	Gene name	Description	Cofactor(s)	Predictions (Subacon)	Subcellular localization	
					GFP fusion, immunodetection	Other proteomic evidence
				Experimental data		References
				Mitoproteome, mitocomplexome		
At3g27180	–	RNA methyltransferase	[4Fe–4S]	Plastid	–	Mito-chondrion (Finkemeier et al., 2011)
At1g79950	RTEL1	Regulator of telomere elongation helicase 1	[4Fe–4S]	Mitochondrion	–	Mito-chondrion (Heazelwood et al., 2004)
At4g19210	ABCE2/RLI2	RNase I inhibitor protein 2	2 × [4Fe–4S]	Cytosol	–	Mitochondrion (Fuchs et al., 2020)
At5g51720	NEET	[2Fe–2S] cluster binding protein	Neet–[2Fe–2S]	Plastid	Plastid, mitochondrion (Su et al., 2013; Nechushtal et al., 2012)	Mitochondrion (Fuchs et al., 2020)
At5g40510	HAA-TLF2	Thioredoxin-like ferredoxin	[2Fe–2S]	Cytosol	–	Mitochondrion (Fuchs et al., 2020)
At5g55900	HAA-TLF4	Thioredoxin-like ferredoxin	[2Fe–2S]	Cytosol	–	Mitochondrion (Fuchs et al., 2020)
<b>ISC machinery</b>						
Locus ID	Gene name	Description	Cofactor(s)	Localization	Experimental data	References
At5g65720	NFS1	Cysteine desulfurase	Pyridoxal phosphate	Mitochondrion	Experimental data GFP fusion, immunodetection	Mitoproteome, mitocomplexome Niehaus et al. (2020)
At5g61220	ISD11	LYR family of Fe–S cluster biogenesis protein	–	Mitochondrion	–	•
At2g44620	ACP1	Acyl carrier protein 1	Phosphopantetheinyl	Mitochondrion	Mitochondrion (Meyer et al., 2007; Fu et al., 2020)	•
At1g65290	ACP2	Acyl carrier protein 2	Phosphopantetheinyl	Mitochondrion	Mitochondrion (Meyer et al., 2007; Fu et al., 2020)	•

Niehaus et al. (2020)

Senkler et al. (2017)

•

•

•

•

•

Table 1. Continued

Locus ID	Gene name	Description	Mitochondrial Fe-S targets				
			Cofactor(s)	Predictions (Subacon)	Subcellular localization		
					GFP fusion, immunodetection	Mitoproteome, mitocomplexome	Other proteomic evidence
				Niehaus <i>et al.</i> (2020)	Senkler <i>et al.</i> (2017)	References	
At5g47630	ACP3	Acyl carrier protein 3	Phosphopantetheinyl	Mitochondrion	Mitochondrion (Fu <i>et al.</i> , 2020)	•••	
At4g05450	mFDX1/ADX2	Mitochondrial ferredoxin 1	[2Fe-2S]	Mitochondrion	Mitochondrion (Takubo <i>et al.</i> , 2003)	•••	
At4g21090	mFDX2/ADX1	Mitochondrial ferredoxin 2	[2Fe-2S]	Mitochondrion	Mitochondrion (Takubo <i>et al.</i> , 2003)	•••	
At4g32360	mFDR	Mitochondrial ferredoxin reductase	FAD	Mitochondrion	Mitochondrion (Takubo <i>et al.</i> , 2003)	•••	•
At4g03240	FH	Frataxin	Fe	Mitochondrion	Mitochondrion (Busi <i>et al.</i> , 2006)	•	
At4g22220	ISU1	Isu-like 1	[2Fe-2S]	Mitochondrion	Mitochondrion (Léon <i>et al.</i> , 2005)	•••	•
At3g01020	ISU2	Isu-like 2	[2Fe-2S]	Mitochondrion	Mitochondrion (Léon <i>et al.</i> , 2005)	•••	
At4g04080	ISU3	Isu-like 3	[2Fe-2S]	Mitochondrion	Mitochondrion (Léon <i>et al.</i> , 2005)	•••	•
At4g37910	HSCA1	Heat shock protein 70	ATP	Mitochondrion	Mitochondrion, cytosol (Xu <i>et al.</i> , 2009)	•••	•
At5g09590	HSCA2	Heat shock protein 70	ATP	Mitochondrion	Mitochondrion (Van Aken <i>et al.</i> , 2009)	•••	•
At5g06410	HSCB	Iron-sulfur cluster co-chaperone protein	–	Mitochondrion	Mitochondrion, cytosol (Xu <i>et al.</i> , 2009)	•••	•
At4g26780	MGE1a	Mitochondrial GRPE 2	–	Mitochondrion	Mitochondrion (Hu <i>et al.</i> , 2012)	•	•
At5g55200	MGE1b	Mitochondrial GRPE 1	–	Mitochondrion	Mitochondrion, plastid (Van Aken <i>et al.</i> , 2009)	•••	•
At3g15660	GRXS15	Glutaredoxin S15	[2Fe-2S]	Mitochondrion	Mitochondrion (Bandyopadhyay <i>et al.</i> , 2008; Moseler <i>et al.</i> , 2015; Ströher <i>et al.</i> , 2016)	•••	•
At1g55805	BOLA1	Bola 1	[2Fe-2S] with GRXS15?	Plastid	Plastid (Couturier <i>et al.</i> , 2014)	•••	•
At5g17560	BOLA4	Bola 4	[2Fe-2S] with GRXS15?	Plastid	Mitochondrion, plastid (Couturier <i>et al.</i> , 2014)	•••	
At2g16710	ISCA1a	A-type Fe-S cluster biosynthesis family protein	[2Fe-2S], [4Fe-4S]	Mitochondrion	–	•••	•



Table 1. Continued

Locus ID	Gene name	Description	Mitochondrial Fe-S targets					
			Cofactor(s)	Predictions (Subacon)	Subcellular localization			
					GFP fusion, immunodetection	Experimental data	Other proteomic evidence	References
At2g36260	ISCA1b	A-type Fe-S cluster biosynthesis family protein	[2Fe-2S], [4Fe-4S]	Mitochondrion	-			
At5g03905	ISCA2	A-type Fe-S cluster biosynthesis family protein	[2Fe-2S], [4Fe-4S]	Mitochondrion	-	•••	•	
At4g12130	IBA57.1	Iron-sulfur cluster assembly factor for biotin synthase- and aconitase-like mitochondrial proteins, with a mass of 57 kDa	[2Fe-2S] with ISCA2, tetrahydrofolate	Mitochondrion	Mitochondrion (Waller <i>et al.</i> , 2012)	•••	•	
At3g20970	NFU4	Nfu domain protein 4	[4Fe-4S]	Mitochondrion	Mitochondrion (Léon <i>et al.</i> , 2003)	•••	•	
At1g51390	NFU5	Nfu domain protein 5	[4Fe-4S]	Mitochondrion	-	•••	•	
At4g19540	INDH	Iron-sulfur protein required for NADH dehydrogenase	[4Fe-4S]	Mitochondrion	Mitochondrion (Wydro <i>et al.</i> , 2013)	•••	•	

Predicted subcellular localizations were retrieved using the Subacon algorithm (Hooper *et al.*, 2017). Verified subcellular localizations by translational GFP fusions or immunodetection are associated with the corresponding references. The presence of each protein was systematically analyzed from a study focusing on mitochondrial complexes (Senkler *et al.*, 2017) and from a global mitochondrial proteome obtained using affinity-purified plant mitochondria (Niehaus *et al.*, 2020). A single dot indicates the presence in mitochondria isolated by this method only, whereas the three dots indicate the presence in highly pure mitochondria subject to an additional separation on gradient centrifugation. For proteins whose localization was uncertain (bottom of the list), evidence for their presence in other plant mitochondrial proteomes has been computed.

Locus ID	Gene name	Transcript abundance								mRNA decay 1/2 time (hour)	Protein copies / mitochondrion	Protein decay 1/2 time (day)
		Root	Stem	Seedling	Leaf	Meristem	Flower	Pollen	Siliqua			
At1g16700	TYKY	..	..	..	..	..	..	..	..	..	120	4.2
At1g79010	TYKY isoform	..	..	..	..	..	..	..	..	..	2770	3.7
At5g11770	PSST (20-kDa)	..	..	..	..	..	..	..	..	15.6	3492	1.9
At4g02580	24-kDa	..	..	..	..	..	..	..	..	13.9	4684	5.1
At5g08530	51-kDa	..	..	..	..	..	..	..	..	12.9	6131	3.2
At5g37510	75-kDa	..	..	..	..	..	..	..	..	10.5	5521	3.7
At3g27380	SDH2-1	..	..	..	..	..	..	..	..	10.8	1002	5.8
At5g40650	SDH2-2	..	..	..	..	..	..	..	..	9.3	3441	9.9
At5g65165	SDH2-3	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
At5g13430	RISP/UCR1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	5.3
At5g13440	RISP/UCR1-like	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
At2g43400	ETFQO	..	..	..	..	..	..	..	..	9.1	313	4.2
At2g43360	BIO2	..	..	..	..	..	..	..	..	1.9	347	..
At2g20860	mLIP1	..	..	..	..	..	..	..	..	13.9	85	..
At2g31955	CNX2	..	..	..	..	..	..	..	..	2.0	219	..
At5g63290	HEMN1	..	..	..	..	..	..	..	..	1.6	38	..
At4g26970	ACO2	..	..	..	..	..	..	..	..	1.3	4222	7.0
At2g05710	ACO3	..	..	..	..	..	..	..	..	8.4	..	5.5
At3g07480	mFDX-Like	..	..	..	..	..	..	..	..	16.7	2613	5.4
At5g23395	MIA40	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
At2g35010	TRXO1	..	..	..	..	..	..	..	..	14.2	837	12.5
At5g04140	GLU1	..	..	..	..	..	..	..	..	6.0	..	..
At2g41220	GLU2	..	..	..	..	..	..	..	..	5.8	32	..
At3g27570	HAA-TLF1	..	..	..	..	..	..	..	..	1.8	1043	2.2
At4g26620	HAA-TLF3	..	..	..	..	..	..	..	..	12.5	437	..
At2g44270	CTU1/ROL5	..	..	..	..	..	..	..	..	4.1	..	..
At1g75200	TYW1	..	..	..	..	..	..	..	..	1.2	474	..

**Fig. 2.** Transcript abundance per organ, protein copies per mitochondrion, and mRNA and protein decay rate for mitochondrial Fe-S proteins. The transcript abundance for each gene of interest was retrieved from CoNekT: an open-source framework for comparative genomic and transcriptomic network analyses (<https://conekt.sbs.ntu.edu.sg/profile/export/species>). Data are expressed as raw transcripts per kilobase million (TPM) values, and for each gene normalized to the maximum expression (with blue and red corresponding to a low and high transcript abundance, respectively). For mRNA decay, mRNA half-lives were retrieved from Narsai et al. (2007). This work reports the mRNA decay rate in heterotrophic Arabidopsis cell cultures treated with the transcription inhibitor actinomycin D. For protein quantification per single mitochondrion, data were retrieved from Fuchs et al. (2020). In this work, the authors performed proteomics on purified mitochondria from cultured heterotrophic Arabidopsis cell cultures with IBAQ (intensity-based absolute quantification) and scaled the dataset to the single organelle based on criteria that are justified by experimental evidence and theoretical considerations. For protein decay, data were retrieved from Li et al. (2017). The authors analyzed >400 mitochondrial proteins and assessed their degradation rates using <sup>15</sup>N labeling. “..” means no available data.

grown under short- or long-day conditions but exhibit early senescence and premature death in dark conditions (Table 2) (Ishizaki et al., 2005, 2006). These mutants also suffer from defects in the development of female gametophyte cells.

#### *The biosynthesis of protein cofactors required by key mitochondrial proteins is dependent on radical S-adenosyl methionine Fe-S enzymes*

In plant mitochondria, Fe-S clusters are also required for enzymes belonging to the radical S-adenosyl-L-methionine (SAM) superfamily. In this case, a [4Fe-4S] cluster commonly

coordinated in a conserved C<sub>X3</sub>C<sub>X2</sub>C motif is used to reductively cleave SAM, producing methionine and a 5'-deoxyadenosyl radical (5'-dA<sup>•</sup>) that is necessary to catalyze many types of biochemical reactions, notably carbon methylation (Broderick et al., 2014). In addition to the cluster required for SAM cleavage, radical SAM enzymes usually incorporate another so-called auxiliary Fe-S cluster with proposed roles in electron transfer, enzyme catalysis, or sulfur donation (Lanz and Booker, 2015).

#### *Lipoic acid synthesis and utilization*

In plants, lipoic acid (or 6,8-dithiooctanoic acid) synthesis occurs in both plastids and mitochondria (Yasuno and Wada,

**Table 2.** Phenotypes of *Arabidopsis thaliana* mutant lines for mitochondrial Fe-S proteins and ISC maturation factors

Short name	AGI number	Type of mutants	Mutant phenotypes	References
<b>Mitochondrial Fe-S targets</b>				
<b>TYKY</b>	At1g16700	Knockout	No morphological phenotype	Pétriacoq <i>et al.</i> (2017)
<b>TYKY isoform</b>	At1g79010	Knockout	No morphological phenotype	Pétriacoq <i>et al.</i> (2017)
		Knockout	Growth retardation phenotype in a double <i>tyky-tyky isoform</i> mutant	Pétriacoq <i>et al.</i> (2017)
<b>PSST (20-kDa)</b>	At5g11770	–	Seedling-lethal	Kühn <i>et al.</i> (2015)
<b>24 kDa</b>	At4g02580	–	Seedling-lethal	Kühn <i>et al.</i> (2015)
<b>51 kDa</b>	At5g08530	Knockout	Seedling-lethal	Kühn <i>et al.</i> (2015)
<b>75 kDa</b>	At5g37510	–	Seedling-lethal	Kühn <i>et al.</i> (2015)
<b>SDH2-1</b>	At3g27380	Knockout	No morphological phenotype	Elorza <i>et al.</i> (2004)
<b>SDH2-2</b>	At5g40650	–	–	–
<b>SDH2-3</b>	At5g65165	Knockout	No morphological phenotype, retarded germination	Roschztardt <i>et al.</i> (2009); Restovic <i>et al.</i> (2017)
		Knockout	A double <i>sdh2-1-sdh2-2</i> or a triple <i>sdh2-1-sdh2-2-sdh2-3</i> is not viable	Restovic <i>et al.</i> (2017)
<b>RISP</b>	At5g13430	–	–	–
<b>RISP-like</b>	At5g13440	–	–	–
<b>ETF:QO</b>	At2g43400	Knockout	Defect in the development of female gametophyte cells, pre-mature death under continuous dark treatment	Ishizaki <i>et al.</i> (2005)
<b>BIO2</b>	At2g43360	EMS mutagenesis	Embryo-lethal (additional undesired mutations)	Patton <i>et al.</i> (1998)
		Knockout	Embryo-lethal unless biotin is provided	Arnal <i>et al.</i> (2006)
<b>mLIP1</b>	At2g20860	–	–	–
<b>CNX2</b>	At2g31955	Knockout	Seedling-lethal	Kruse <i>et al.</i> (2018)
		Amino acid substitution	Dwarf and chlorotic	Kruse <i>et al.</i> (2018)
<b>HEMN1</b>	At5g63290	Knockout	Embryo-lethal	Pratibha <i>et al.</i> (2017)
<b>ACO2</b>	At4g26970	Knockout	No morphological phenotype, enhanced tolerance to oxidative stress	Amaud <i>et al.</i> (2007); Moeder <i>et al.</i> (2007); Bernard <i>et al.</i> (2009); Hooks <i>et al.</i> (2014)
<b>ACO3</b>	At2g05710	Knockout	No morphological phenotype, enhanced tolerance to oxidative stress	Amaud <i>et al.</i> (2007); Moeder <i>et al.</i> (2007); Bernard <i>et al.</i> (2009)
		Knockout	Delayed early seedling growth under constant light and without addition of an external carbon source	Hooks <i>et al.</i> (2014)
<b>mFDX-like</b>	At3g07480	Knockout	No morphological phenotype	Hansen <i>et al.</i> (2018)
<b>MIA40</b>	At5g23395	Knockout	No morphological phenotype	Carrie <i>et al.</i> (2010)
<b>TRXO1</b>	At2g35010	Knockout	No morphological phenotype	Yoshida and Hisabori (2016)
		Knockout	No morphological phenotype in a double <i>trxo1-trxo2</i> mutant	Yoshida and Hisabori (2016)
<b>GLU1</b>	At5g04140	EMS mutagenesis, knockout	Reduced growth and pale-green phenotype	Jamai <i>et al.</i> (2009); Muñoz-Nortes <i>et al.</i> (2017)
<b>GLU2</b>	At2g41220	Knockdown	No morphological phenotype	Potel <i>et al.</i> (2009)
<b>HAA-TLF1</b>	At3g27570	–	–	–
<b>HAA-TLF3</b>	At4g26620	–	–	–
<b>CTU1</b>	At2g44270	EMS mutagenesis	Short root phenotype	Leiber <i>et al.</i> (2010)
<b>TYW1</b>	At1g75200	–	–	–

Table 2. Continued

<b>ISC machinery</b>								
<b>NFS1</b>	At5g65720	Knockout Knockdown	Embryo-lethal Abnormal plant growth and development, chlorotic	Frazzon et al. (2007) Frazzon et al. (2007); Bernard et al. (2013); Armas et al. (2019)				
<b>ISD11</b>	At5g61220	-	-	-				
<b>ACP1</b>	At2g44620	Knockout	No morphological phenotype	Fu et al. (2020)				
<b>ACP2</b>	At1g65290	Knockout	No morphological phenotype	Fu et al. (2020)				
<b>ACP3</b>	At5g47630	Knockout	No morphological phenotype	Fu et al. (2020)				
		Knockout	A double <i>macp1-macp2</i> has a growth retardation phenotype and a triple <i>macp1-macp2-macp3</i> is not viable	Fu et al. 2020				
<b>mFDX1</b>	At4g05450	Knockout	Embryo-lethal	Pagnussat et al. (2005); Boavida et al. (2009)				
<b>mFDX2</b>	At4g21090	-	-	-				
<b>mFDR</b>	At4g32360	-	-	-				
<b>FH</b>	At4g03240	Knockout	Embryo-lethal	Busi et al. (2006); Vazzola et al. (2007)				
		Knockdown	Retarded growth	Busi et al. (2006)				
<b>ISU1</b>	At4g22220	Knockdown	Abnormal plant growth and development, chlorotic	Frazzon et al. (2007)				
<b>ISU2</b>	At3g01020	Knockdown	Abnormal plant growth and development, chlorotic	Frazzon et al. (2007)				
<b>ISU3</b>	At4g04080	Knockdown	Abnormal plant growth and development, chlorotic	Frazzon et al. (2007)				
<b>HSCA1</b>	At4g37910	Knockout	Severe growth retardation	Wei et al. (2019)				
<b>HSCA2</b>	At5g09590	Knockout	No morphological phenotype	Wei et al. (2019)				
<b>HSCB</b>	At5g06410	Knockout	Reduced seed set, waxless phenotype, and inappropriate trichome development	Xu et al. (2009)				
		Knockdown	Reduced shoot growth, chlorotic	Leadon et al. (2016)				
<b>MGE1a</b>	At4g26780	-	-	-				
<b>MGE1b</b>	At5g55200	-	-	-				
<b>GRXS15</b>	At3g15660	Knockout	Embryo-lethal	Mosele et al. (2015)				
		Knockdown (RNAi)	Root growth phenotype, reduced shoot growth under long-day photoperiod, arsenic sensitivity	Ströher et al. (2016)				
<b>BOLA1</b>	At1g55805	-	-	-				
<b>BOLA4</b>	At5g17560	-	-	-				
<b>ISCA1a</b>	At2g16710	-	-	-				
<b>ISCA1b</b>	At2g36260	-	-	-				
<b>ISCA2</b>	At5g03905	-	-	-				
<b>IBA57.1</b>	At4g12130	Knockout	Embryo-lethal	Waller et al. (2012)				
<b>NFU4</b>	At3g20970	-	-	-				
<b>NFU5</b>	At1g51390	-	-	-				
<b>IND1</b>	At4g19540	Knockout	Seedling-lethal, survive on sucrose, and achieve post-embryonic growth	Wydro et al. (2013)				

2002). This cofactor is a derivative of octanoic acid produced via the fatty acid synthesis pathway. During the last steps of protein lipoylation, the octanoyl moiety is transferred by an octanoyl transferase to a conserved lysine of target apoproteins before lipoyl synthase inserts two sulfur atoms into the C<sub>6</sub> and C<sub>8</sub> positions, resulting in functional lipoylated proteins (Cronan, 2016, 2018). The *Escherichia coli* lipoyl synthase Lip5 incorporates two [4Fe–4S] clusters (Cicchillo *et al.*, 2004). The radical SAM [4Fe–4S] cluster essential for enzyme activity is ligated via Cys residues present in the canonical Cx<sub>3</sub>Cx<sub>2</sub>C motif, whereas the auxiliary [4Fe–4S] cluster, proposed to provide sulfur atoms upon cycles of degradation and repair steps, is ligated via Cys residues contained in a Cx<sub>4</sub>Cx<sub>5</sub>C motif and unusually via a Ser residue (Cicchillo *et al.*, 2004; Harmer *et al.*, 2014). Although the plastidial (cLIP1) and mitochondrial (mLIP1) Arabidopsis lipoyl synthases have not been biochemically characterized, the residues and motifs involved in Fe–S cluster ligation are conserved in both enzymes (Przybyla-Toscano *et al.*, 2021). There is no functional study either, but Arabidopsis mutants affected in the first steps of mitochondrial lipoyl acid synthesis are lethal (Ewald *et al.*, 2014).

In plants, at least four mitochondrial enzymatic complexes depend on lipoyl acid for their activity: pyruvate dehydrogenase (PDH),  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase (KGDH), branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase (BCKDH), and glycine decarboxylase (GDC; also known as glycine cleavage system) (Fig. 1). PDH and KGDH participate in the TCA cycle and catalyze the decarboxylation of pyruvate to acetyl-CoA and of  $\alpha$ -ketoglutarate to succinyl-CoA, respectively. The BCKDH complex is involved in the catabolism of branched chain amino acids (BCAAs) and has also been hypothesized to contribute to energy metabolism by providing NADH to complex I (Taylor *et al.*, 2004; Schertl and Braun, 2014; Peng *et al.*, 2015). These three multiprotein complexes share a three-subunit architecture (E1–E3), the E2 subunits containing a lipoyl acid covalently bound to a Lys residue (Rébeillé *et al.*, 2007). The GDC complex, involved in photorespiration and one-carbon metabolism, is structurally different (Douce *et al.*, 2001). It is composed of four proteins named GDC-P, -T, -L, and -H, the latter protein binding the lipoyl acid cofactor also on a conserved Lys residue. In Arabidopsis, there are two genes coding for P and L proteins, three genes for H protein, and only one gene for T protein (Keech *et al.*, 2017).

Only scarce functional information has been obtained for these lipoyl-dependent protein complexes in plants. The consequences of a deregulation in the genes encoding the KGDH complex subunits have never been explored in plants so far. Concerning PDH, the E1 component is in fact a heterodimer formed by a catalytic E1 $\alpha$  subunit and a regulatory E1 $\beta$  subunit. Disruption of the E1 $\beta$  subunit-encoding gene causes an early embryo-lethal phenotype in Arabidopsis (Ohbayashi *et al.*, 2019). The E2 subunit is encoded by three different genes, namely *mtE2-1*, *mtE2-2*, and *mtE2-3*. An Arabidopsis insertion line for the *mtE2-2* gene is embryo-lethal whereas

mutations in the *mtE2-1* and *mtE2-3* genes had minor or no effect on plant growth and development (Song and Liu, 2015). Concerning the BCKDH complex, only mutants affected in the E1 $\alpha$  and E1 $\beta$  subunits have been characterized in Arabidopsis. They accumulate higher levels of BCAAs in seeds and exhibit an early senescence phenotype in prolonged darkness (Peng *et al.*, 2015). Concerning GDC, an extinction mutant for the two *GDC-P* genes is not fully viable and can only develop to the cotyledon stage in air enriched with 0.9% CO<sub>2</sub> (i.e. non-photorespiratory conditions that minimize the synthesis of 2-phosphoglycolate by Rubisco), demonstrating firstly the essential nature of this complex, and secondly its involvement in metabolic processes other than photorespiration (Engel *et al.*, 2007). Arabidopsis lines overexpressing a cDNA encoding an H protein from *Flaveria pringlei* (Timm *et al.*, 2012) or from Arabidopsis (López-Calcano *et al.*, 2019) showed an improved growth. This is probably explained by the alleviated feedback inhibition of photosynthesis from photorespiratory intermediates.

#### Biotin synthesis and utilization

Biotin, also known as vitamin B<sub>8</sub>, is a cofactor for enzymes involved in carboxylation, decarboxylation, and transcarboxylation reactions (Knowles, 1989). Its biosynthetic pathway has been initially investigated in bacteria, and the data obtained from studies conducted in plants suggest that it is conserved (Baldet and Ruffet, 1996; Patton *et al.*, 1996). Of note, some eukaryotic organisms, including humans, are auxotrophic for biotin. By analogy with bacteria, biotin is synthesized from the pimeloyl-CoA precursor, and synthesis requires at least four successive biochemical steps in plants, but only three proteins: a 7-keto-8-aminopelargonic acid (KAPA) synthase, a fusion protein coupling the 7,8-diaminopelargonic acid (DAPA) aminotransferase and the dethiobiotin (DTB) synthetase activities, and a biotin synthase (BIO2) (Alban *et al.*, 2000; Pinon *et al.*, 2005; Muralla *et al.*, 2008; Tanabe *et al.*, 2011; Cobessi *et al.*, 2012). The first enzyme is present in the cytosol and peroxisomes, whereas the other two enzymes are present in mitochondria (Rébeillé *et al.*, 2007). The radical SAM enzyme BIO2 catalyzes the conversion of DTB to biotin at the expense of ferredoxin (FDX) by adding a sulfur atom between the C<sub>6</sub> and C<sub>9</sub> atoms of DTB (Fig. 1) (Picciocchi *et al.*, 2003). The sulfur atom is donated by the auxiliary [2Fe–2S] cluster present in BIO2 (Baldet *et al.*, 1997). Arabidopsis mutants deficient in *BIO2* are embryo-lethal, highlighting the importance of biotin-dependent metabolic processes for plant viability (Table 2) (Patton *et al.*, 1998; Arnal *et al.*, 2006). Interestingly, the lethality and the subsequent vegetative and reproductive development is rescued by the addition of exogenous biotin (Arnal *et al.*, 2006). Only a restricted number of biotinylated proteins are present in plants. Four biotin-dependent carboxylase activities have been evidenced: two structurally distinct isoforms of acetyl-CoA carboxylase (ACCase) in cytosol and plastids, geranyl-CoA carboxylase in plastids, and

methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCCase) in mitochondria (Alban *et al.*, 2000). All these enzymes share a common reaction mechanism, in which biotin, covalently bound to one subunit of multimeric complexes via a conserved Lys residue, is used to insert a carboxyl group into the acceptor substrate (Alban *et al.*, 2000). The biotin cofactor in these enzymes is inserted via the action of biotin protein ligases also referred to as holocarboxylase synthetases represented by two genes (*HCS1* and *HCS2*) in Arabidopsis (Puyaubert *et al.*, 2008). The ACCases are involved in fatty acid biosynthesis and catalyze the carboxylation of acetyl-CoA to produce malonyl-CoA. Only the biotin carboxy-carrier proteins (BCCP1 and BCCP2 in Arabidopsis) present in the ACCase complexes bind biotin (Li *et al.*, 2011). It is noteworthy that Arabidopsis mutants for *HCS1* and *BCCP2* are embryo-lethal, pinpointing again the importance of biotin in plants (Puyaubert *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011). So far, there is no specific gene(s) in Arabidopsis associated with the geranyl-CoA carboxylase activity which was detected in maize and consists of the carboxylation of geranyl-CoA to  $\gamma$ -carboxygeranyl-CoA, a reaction supposedly participating in the synthesis of non-cyclic isoprenoid (Guan *et al.*, 1999). The MCCase is involved in Leu degradation and ensures the ATP-dependent conversion of methylcrotonyl-CoA to methylglutaconyl-CoA (Ding *et al.*, 2012). As the sole biotin-dependent mitochondrial enzyme, the MCCase will be described in more detail.

MCCase is a heteromeric enzyme composed of biotin-containing (MCC-A) and non-biotin-containing (MCC-B) subunits (Ding *et al.*, 2012). Arabidopsis insertion knockout mutants for both *MCC-A* and *MCC-B* genes are viable and vegetative growth is not affected (Ding *et al.*, 2012). However, this work demonstrated that a functional MCCase is needed for the development of reproductive organs as mutants exhibit an aberrant flower and silique development and decreased seed germination. In accordance with the MCCase function in Leu degradation, the mutants accumulated the 3-methylcrotonyl-CoA substrate but also Leu upon dark exposure. Finally, in addition to the four biotin-dependent carboxylase activities, a seed-specific biotinylated protein without catalytic functions and initially discovered in pea was named seed biotinylated protein of 65 kDa (SBP65) (Duval *et al.*, 1994). It is suggested to function as a putative sink for biotin during embryogenesis. Orthologs of SBP65 belonging to the late embryogenesis abundant protein family are found in various plant species, including Arabidopsis (Job *et al.*, 2001). Noticeably, *BIO2* expression is the highest in seeds (Fig. 2).

#### Molybdenum cofactor synthesis and utilization

The molybdenum cofactor (Moco) consists of a molybdenum atom coordinated to the dithiolate moiety of a tricyclic pterin referred to as molybdopterin (MPT) (Rajagopalan and Johnson, 1992). Although there are only a few Moco-dependent enzymes in eukaryotes and in plants in particular, Moco biosynthesis is crucial for plant growth and development (Mendel,

2013). The biosynthetic pathway has been well characterized in plants. Synthesis starts in mitochondria with the conversion of GTP into cyclic pyranopterin monophosphate (cPMP) (Mendel, 2013). This reaction is catalyzed by the Fe-S cluster-containing CNX2 (cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase 2) protein (Fig. 1). A structure of the bacterial MoaA ortholog revealed the presence of two [4Fe-4S] clusters (Hänzelmann and Schindelin, 2004). The Fe-S cluster typical of radical SAM enzymes is ligated by Cys residues present in an N-terminal CX<sub>3</sub>CX<sub>2</sub>C motif, whereas the second Fe-S cluster is bound using Cys residues present in the C-terminal part in a CX<sub>2</sub>CX<sub>13</sub>C motif. All these Cys residues are conserved in the Arabidopsis CNX2 sequence, suggesting that the reaction mechanisms and enzyme properties should be conserved (Przybyla-Toscano *et al.*, 2021). A *cnx2* knockout mutant is lethal at the seedling stage and cannot survive without ammonia as a nitrogen source (Kruse *et al.*, 2018). This indicates that a defect in nitrate reductase is the main growth defect caused by Moco deficiency in Arabidopsis. Viable *cnx2* plants bearing a mutation of an arginine contained in the CX<sub>3</sub>CX<sub>2</sub>C motif are small and chlorotic (Kruse *et al.*, 2018). Then, cPMP is exported to the cytosol, where it serves for the subsequent formation of MPT, adenylated MPT, and Moco in three additional enzymatic steps before the final insertion of Moco into apo-targets (Mendel, 2013; Mendel and Leimkühler, 2015). The cPMP precursor was initially proposed to be exported via the ATM3 transporter based notably on the observation that it is accumulated in mitochondria from *atm3* mutants (Teschner *et al.*, 2010). As this transporter is also required for the synthesis of cytosolic Fe-S proteins, this provided another intersection point between Fe-S and molybdenum cofactor synthesis (Bernard *et al.*, 2009). However, another study relying on a different experimental procedure for measuring cPMP reported that its accumulation was, on the contrary, reduced in both *atm3* and *cnx2* mutants (Kruse *et al.*, 2018). Overall, this raises questions about the existence of a specific cPMP transporter.

There are two different Moco moieties in plants, the one found in sulfite oxidase (SOX), nitrate reductase (NR), and mitochondrial amidoxime-reducing component (mARC) families, and the one found in the xanthine dehydrogenase (XDH) and aldehyde oxidase (AAO) families. In the latter case, an additional maturation step catalyzed by ABA3 consists of an additional sulfuration step of Moco (Havemeyer *et al.*, 2006; Schwarz and Mendel, 2006; Mendel, 2013). Since NR, XDH, and AAO enzymes are cytosolic and SOX is peroxisomal, the sole mitochondrial Moco-dependent protein may be the mARC (Havemeyer *et al.*, 2006). This would imply a mechanism for Moco transport back to mitochondria or for the transport of holo-mARC. The mARC enzymes catalyze the reduction of a broad range of *N*-hydroxylated compounds in human liver mitochondria (Ott *et al.*, 2015). However, the unique *Chlamydomonas* ARC was found to be cytosolic (Chamizo-Ampudia *et al.*, 2016), and both Arabidopsis ARCs lack a clear MTS and are absent from currently published plant

mitochondrial proteomes. To the best of our knowledge, a role for ARC proteins in plants was associated with nitric oxide production (Chamizo-Ampudia *et al.*, 2017). The Moco carrier proteins (MCPs) bind Moco but not for catalytic purposes and thus they may serve for the cellular distribution of Moco (Kruse *et al.*, 2010). They constitute a sixth class of Moco-binding proteins. It is worth noting that XDH and AAO also bind an Fe–S cluster whose synthesis by the cytosolic CIA machinery depends on ATM3 and thus on the mitochondrial ISC machinery (Teschner *et al.*, 2010).

#### Heme synthesis and utilization

The whole tetrapyrrole biosynthesis pathway is present in plastids (Tanaka and Tanaka, 2007). However, a few studies also report the presence of certain enzymes required for heme synthesis in plant mitochondria. The current view is that uroporphyrinogen and/or coproporphyrinogen are translocated to mitochondria and that coproporphyrinogen III oxidase (CPOX), protoporphyrinogen IX oxidase (PPOX), and ferrochelatases, which catalyze the late stage reactions of heme synthesis, also operate in mitochondria (Watanabe *et al.*, 2001; Hey *et al.*, 2016; Pratibha *et al.*, 2017). The mitochondrial localization of the single Arabidopsis coproporphyrinogen III oxidase, HEMN1, was recently confirmed (Pratibha *et al.*, 2017), and the presence of *HEMN1* transcripts in roots may support this localization (Fig. 2). This enzyme, initially identified by genetic approaches in bacteria, catalyzes the oxidative decarboxylation of coproporphyrinogen III into protoporphyrinogen IX (Coomber *et al.*, 1992). The elucidation of the *Escherichia coli* HemN structure revealed the presence of a [4Fe–4S] cluster as in other radical SAM enzymes (Layer *et al.*, 2003). Although Arabidopsis HEMN1 has not been biochemically characterized, it contains the canonical C<sub>X3</sub>C<sub>X2</sub>C motif (Jin *et al.*, 2020). Arabidopsis T-DNA insertion mutant lines in the *HEMN1* locus are affected in gametophytic development leading to lethality (Pratibha *et al.*, 2017). This phenotype is not surprising considering the number and importance of hemoproteins in this organelle (Przybyla-Toscano *et al.*, 2021).

#### Ferredoxin-dependent processes in mitochondria

In eukaryotes, FDXs are small monomeric proteins bearing [2Fe–2S] clusters. It is well documented that numerous plastidial proteins, binding either an Fe–S cluster or another prosthetic group and requiring the supply of electrons, depend on multiple FDX isoforms (Przybyla-Toscano *et al.*, 2018). In contrast, the characterization of FDX-dependent enzymes/pathways in mitochondria clearly lags behind, despite the existence of two to three mitochondrial FDXs (mFDXs) in most photosynthetic organisms. In yeast, the sole mitochondrial isoform Yah1 is required for the *de novo* Fe–S cluster biosynthesis (see below) (Lange *et al.*, 2000; Weibert *et al.*, 2014) but also for coenzyme Q biosynthesis, providing electrons to the

flavin-dependent monooxygenase Coq6 (Pierrel *et al.*, 2010). Although not characterized, a Coq6 homolog (At3g24200) is present in Arabidopsis and this may pre-figure that it has the same FDX dependency. In human, two FDXs with distinct biochemical properties are present in mitochondria. FDX1, also referred to as adrenodoxin, participates in adrenal steroid hormone biosynthesis, and vitamin D and bile acid metabolism, owing to its ability to support the activity of several cytochrome P450 monooxygenases (Ewen *et al.*, 2012). In contrast, FDX2 is essential for the maturation of Fe–S proteins and the biosynthesis of heme A (Sheftel *et al.*, 2010; Weibert *et al.*, 2014). A requirement of FDX1 in the biogenesis of Fe–S clusters has been suggested in some studies because Fe–S cluster assembly on the ISCU scaffold proved to work *in vitro* and the activity of some Fe–S enzymes is decreased in siRNA *fdx1* human cell lines (Shi *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2017). However, the latter observation may be due to indirect effects.

In Arabidopsis, three mitochondrial isoforms have been detected (Takubo *et al.*, 2003; Carrie *et al.*, 2009). mFDX1 and mFDX2 are very similar (87% sequence identity for the presumed mature forms) whereas the third atypical mFDX-like protein shares only 21% sequence identity with the two other Arabidopsis mFDXs (Supplementary Fig. S1). Moreover, mFDX1 and mFDX2 possess the four conserved Cys residues involved in Fe–S cluster binding, whereas one Cys is missing in mFDX-like and the position of another one is likely to be shifted by one residue, raising questions about its capacity to bind an Fe–S cluster. Finally, most acidic residues probably involved in the interaction of mitochondrial FDXs with the mitochondrial NADPH-dependent ferredoxin reductase (mFDR), as deduced from the tridimensional structure of a bovine adrenodoxin–adrenodoxin reductase complex (Müller *et al.*, 2001), are present in mFDX1 and mFDX2 but not in mFDX-like. All of this raises questions about the partners and functions of the latter isoform. Interestingly, mFDX-like is present in high protein copy number as compared with regular mFDXs, which seems to correlate with an important difference in transcript stability (Figs 2, 4). The fact that mFDX-like is present only in photosynthetic organisms suggests the existence of very specific functions. An *mfdx-like* mutant was reported to have no phenotype when grown under standard conditions but a decreased abundance of the respiratory chain complex I (Hansen *et al.*, 2018) in accordance with the observation that the mFDX-like protein associated with complex I (Senkler *et al.*, 2017). As orthologs of the human mFDX2, both Arabidopsis mFDX1 and mFDX2 may participate in Fe–S protein maturation, but this has never been explored so far. Surprisingly, despite the strong similarity of AtmFDX1 and AtmFDX2 proteins, *mfdx1* loss-of-function mutants exhibited male and female gametophyte lethality, suggesting that both isoforms might have different or only partially overlapping functions or expression patterns (Table 2) (Pagnussat *et al.*, 2005; Boavida *et al.*, 2009).

To date, only a few mitochondrial enzymes have been shown to rely on mFDXs for their activity. This is the case of the biotin synthase BIO2 for which both mFDX1 and mFDX2 were shown to support its activity *in vitro* (Picciocchi *et al.*, 2003). It is possible that a similar function is needed for other radical SAM enzymes (mLIP1, CNX2, HEMN, and TYW1) since one electron has to be transferred to and relayed by the [4Fe–4S] cluster during SAM cleavage (Cicchillo *et al.*, 2004). Another potential FDX-dependent enzyme in mitochondria is the ferredoxin-dependent glutamate synthase (GOGAT) 1, GLU1 (Jamai *et al.*, 2009), but also possibly GLU2. Before this study, GOGATs were thought to be expressed exclusively in chloroplasts serving in the primary assimilation of ammonia but also in its re-assimilation during photorespiration (Somerville and Ogren, 1980; Coschigano *et al.*, 1998). As a consequence, an Arabidopsis *glu1* mutant exhibits a conditional lethal phenotype as plants are not viable under atmospheric conditions but grow normally in non-photorespiratory conditions (Somerville and Ogren, 1980). Other mutants obtained by chemical mutagenesis using ethyl methanesulfonate have reduced leaf growth and pale green pigmentation (Muñoz-Nortes *et al.*, 2017). A dual chloroplastic and mitochondrial localization was described for GLU1, relying on two different translation initiation sites with the use of Met residues at positions 1 and 3 for a chloroplast and mitochondrial localization, respectively (Jamai *et al.*, 2009). This second adjacent Met is found in orthologs present in some Brassicaceae species such as *Brassica rapa* and *Capsella grandiflora*, but not in the majority of the plant GLU isoforms and not in Arabidopsis GLU2, the second [3Fe–4S]- and FMN-containing glutamate synthase (Suzuki and Rothstein, 1997). Despite this, both GLU1 and GLU2 are detected in the Arabidopsis mitoproteome and/or complexome (Table 1). The role of GLU1 in mitochondria was reported to sustain the photorespiratory activity of the serine hydroxymethyl-transferase SHMT1 by physically interacting with it (Jamai *et al.*, 2009). However, a catalytically inactive GLU1 was operational as well, thus suggesting that electron supply by mFDX is not mandatory for this function. Additional roles beyond photorespiration and relying on mFDXs may, however, be expected based on the fact that *GLU1* (Muñoz-Nortes *et al.*, 2017) and *GLU2* (Fig. 2) are expressed in roots.

Finally, by analogy with the mammalian FDX1, mFDXs may also serve as electron donors for mitochondrial cytochrome P450 monooxygenases in plants. However, phylogenetic and subcellular prediction analyses (Omura and Gotoh, 2017) suggest that plants do not have mitochondrial representatives. Still, the information about their subcellular localizations is so scarce that we cannot exclude that a limited number are present in mitochondria after acquiring an MTS as for the few chloroplastic members reported. Out of 251 cytochrome P450 monooxygenases present in Arabidopsis (Przybyla-Toscano *et al.*, 2021), only three are predicted to be located in mitochondria, with an additional one (CYP703A2) being retrieved in a

proteomic study (Finkemeier *et al.*, 2011). Their localization will have to be validated case-by-case as it is quite common not to be able to distinguish an MTS from chloroplastic targeting sequences and even membrane-anchoring domains or signal peptides for endoplasmic reticulum (ER) targeting.

#### *Are there additional mitochondrial Fe–S proteins?*

In the next subsections, we discuss several uncertain cases including proteins that were annotated as mitochondrial isoforms in a previous review (Balk and Pilon, 2011) or newly identified in an effort at building a gene atlas of all iron-containing proteins present in Arabidopsis (Przybyla-Toscano *et al.*, 2021). Note that this atlas is shared with the community as a TAIR-hosted implementable resource.

Firstly, there are proteins whose mitochondrial localization has been experimentally verified but for which the relevance of the observed Fe–S cluster binding properties demonstrated *in vitro* has not been validated *in vivo* yet. A second category corresponds to proteins belonging to families known to bind an Fe–S cluster and possessing the putative ligands, but for which the subcellular localization has not been verified or is controversial. There are two cases here, proteins without a typical MTS but isolated in mitochondrial proteomes, or proteins with a putative MTS (even though it is not always trivial to distinguish between chloroplastic or mitochondrial targeting sequences or to anticipate a dual localization) but not detected in mitochondrial proteomes. For all these proteins, we have systematically computed evidence supporting or not a mitochondrial localization by combining sequence analysis for the presence of N-terminal targeting sequences (predictions via Subacon and analysis of the peptide coverage) with the thorough analysis of proteomes/complexomes from isolated organelles and with the data reported in other eukaryotes. In particular, we made use of the recently released proteomic data obtained on highly pure plant mitochondria (Niehaus *et al.*, 2020).

#### *RNA modifications and related processes*

Several Fe–S enzymes have been described, notably in bacteria and yeast, to have a prevalent role in the post-transcriptional modifications of rRNA or tRNA or in the post-translational modification of ribosomal proteins. Owing to the endosymbiotic origin of eukaryote organelles and because mitochondria (and chloroplasts) have their own genomes and transcription and translation machineries, we have particularly scrutinized Fe–S protein families involved in genome maintenance and RNA modifications in bacteria as orthologous proteins are susceptible to be present in organelles.

Two Fe–S enzymes are known to modify rRNA in *E. coli*. The radical SAM enzyme RlmN methylates 23S rRNA, modifying the C2 or C8 position of adenosine 2503. The *E. coli* RlmN protein possesses the usual Cys ligands in a C<sub>x</sub><sub>3</sub>C<sub>x</sub><sub>2</sub>C motif serving for the ligation of a [4Fe–4S] cluster (Boal *et al.*,



2011). The previously identified ortholog (At1g60230) was predicted to be located in mitochondria (Balk and Pilon, 2011). However, it is not found in Arabidopsis mitochondrial proteomes and the complexome (Table 1). In fact, two additional representatives (At3g19630 and At2g39670) are present in Arabidopsis, and the At2g39670 protein which possesses an N-terminal extension, as the At1g60230 protein does, was found in a mitochondrial proteome despite a predicted plastidial localization (Fuchs *et al.*, 2020). The At3g19630 protein is supposedly cytosolic. Hence, the subcellular localization of these isoforms will have to be experimentally determined. The *E. coli* RumA is a SAM-dependent RNA methyltransferase that catalyzes the transfer of a methyl group from SAM specifically to uridine 1939 of 23S rRNA to yield 5-methyluridine (Lee *et al.*, 2004). It contains four conserved Cys residues (Cys81, Cys87, Cys90, and Cys162) that coordinate a [4Fe–4S] cluster. Two uncharacterized orthologs (TRM2A/At3g21300 and At3g27180) indeed annotated as RNA methyltransferases and bearing the same Cys motif are present in Arabidopsis. TRM2A was identified in a screen for chilling-sensitive mutants and was predicted to be located in chloroplasts (S. Wang *et al.*, 2016). In fact, TRM2A seems to have an N-terminal extension and almost all subcellular prediction programs agree about a mitochondrial localization. Accordingly, the protein was detected in some mitochondrial proteome studies (Table 1), as was the At3g27180 protein in a proteomic search of organellar acetylated proteins (Finkemeier *et al.*, 2011), despite the absence of a clear N-terminal extension.

Among Fe–S enzymes known to modify tRNA are members of the Ctu/Ncs6/TtuA family which are required for thiolation reaction of the wobble uridine 34 (Björk *et al.*, 2007; Delaunay *et al.*, 2016). *Thermus thermophilus* TtuA incorporates a single [4Fe–4S] cluster that is coordinated by three conserved Cys residues (Cys130, Cys133, and Cys222) (Chen *et al.*, 2017). Two potential functional orthologs possessing these conserved Cys residues are present in Arabidopsis, namely ROL5/CTU1 (At2g44270) and CTU1-like (At1g76170). Among them, only ROL5 has been localized in mitochondria according to the presence of a small N-terminal extension (Leiber *et al.*, 2010), but it is also found in the cytosol and to interact with the cytosolic and nuclear glutaredoxin S17, and ubiquitin-related modifier 11 and 12 (URM11 and URM12) (Leiber *et al.*, 2010; John *et al.*, 2014; Iñigo *et al.*, 2016). Overall, this suggests a dual mitochondrial and cytosolic localization for this protein as observed for the yeast *ncs6* ortholog (Huh *et al.*, 2003; Noma *et al.*, 2009). In fact, a defect in yeast *ncs6* only affects cytoplasmic tRNAs, and the protein was suggested to have another function in mitochondria. The biological significance of ROL5 in plant mitochondria remains to be deciphered as well; a link with the TOR (target of rapamycin) signaling network has been proposed (Leiber *et al.*, 2010). A *rol5* mutation induced changes in cell wall structure and affected root development (Leiber *et al.*, 2010).

Other putative mitochondrial Fe–S proteins are the functional equivalents of some bacterial radical SAM Fe–S enzymes, namely Tyw1, MiaB, MtaB, and RimO. The Tyw1 protein catalyzes the formation of wybutosine at guanosine 37 of tRNA (Noma *et al.*, 2006), the MiaB and MtaB methylthiotransferases (MTTases) catalyze the methylthiolation of adenosine 37 of tRNAs (Pierrel *et al.*, 2002; Waas *et al.*, 2005; Anton *et al.*, 2008), and the miaB-like RimO proteins catalyze the methylthiolation of an aspartate residue of the ribosomal protein S12 in bacteria (Arragain *et al.*, 2010). These enzymes incorporate one [4Fe–4S] cluster in addition to the [4Fe–4S] cluster chelated via Cys residues contained in the hallmark sequence motif CX<sub>3</sub>CX<sub>2</sub>C of radical SAM enzymes (Hernández *et al.*, 2007; Greenwood *et al.*, 2009; Perche-Letuvé *et al.*, 2012; Forouhar *et al.*, 2013; Bouvier *et al.*, 2014; Grell *et al.*, 2018). The Cys motifs responsible for the binding of the auxiliary [4Fe–4S] clusters are more variable. In the case of archaeal TYW1, the additional [4Fe–4S] cluster is incorporated in a CX<sub>12</sub>CX<sub>12</sub>C motif, whereas crystallographic and spectroscopic evidence indicated that the auxiliary [4Fe–4S] cluster in MTTases including RimO is ligated via N-terminal Cys residues present in a CX<sub>34–36</sub>CX<sub>28–37</sub>C motif found in the so-called UPF0004 domain. In the case of MiaB proteins, the auxiliary [4Fe–4S] cluster probably provides the required sulfur atom constituting an additional example of such a ‘sacrificial’ role attributed to auxiliary [4Fe–4S] clusters present in radical SAM enzymes (Zhang *et al.*, 2020). Although their exact function and respective importance have not been explored in plant cells, one TYW1 and two MMTase orthologs are present in Arabidopsis. They all possess the conserved Fe–S cluster-binding Cys residues. Arabidopsis TYW1 is predicted to be a mitochondrial protein (Table 1). Moreover, the fact that TYW1 is also detected in mitochondrial proteomes and the complexome from Arabidopsis, and that one isoform is detected in mitochondria from *Trypanosoma brucei* (Sample *et al.*, 2015), reinforces these predictions. In the case of MTTases, the presence of the two MIAB representatives (At4g36390 and At1g72090) in Arabidopsis mitochondria is less obvious. The At4g36390 protein was previously predicted to be either in mitochondria or in chloroplasts (Balk and Pilon, 2011), but it is not detected in Arabidopsis mitochondrial proteomes and complexome (Table 1). Yet, human MIAB has been demonstrated to be an MTTase contributing to the modification of mitochondrial tRNA (Reiter *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2015). The At4g36390 protein does not have any N-terminal extension and was found in an ER proteome (Dunkley *et al.*, 2006).

#### *Novel proteins with a C-terminal thioredoxin-like ferredoxin domain*

Recently, yeast proteins possessing a thioredoxin-like ferredoxin (TLF) domain, namely Apd1/Aim32, have been characterized. This domain of ~100 amino acids was initially referred to as sucrose\_ferredoxin-like (pfam06999) but was renamed Homologs of Apd1/Aim32 Thioredoxin-Like Ferredoxins (HAA-TLF) family (Stegmaier *et al.*, 2019). In

eukaryotic and bacterial members, the TLF domain is present in the C-terminal region, with some isoforms including those in plants having a longer C-terminal region eventually forming an additional domain (Stegmaier *et al.*, 2019). In yeast, Apd1 is found in the cytosol and Aim32 in the mitochondrial matrix despite having no clear MTS (Stegmaier *et al.*, 2019). The similarity is generally weak between both proteins, but they were shown to bind a [2Fe–2S] cluster using two cysteinyl and two histidinyl ligands found, respectively, in CX<sub>8</sub>C and HXGGH motifs (Tang *et al.*, 2015; Stegmaier *et al.*, 2019). The function is currently unclear since deletion of *apd1* or *aim32* genes in yeast does not result in a growth defect. Yet, the perturbed growth of  $\Delta$ *apd1* cells in the presence of the redox mediator gallobenzophenone suggests a role in the detoxification of aromatic compounds (Stegmaier *et al.*, 2019). There are four Arabidopsis orthologs forming two clades from sequence similarity, HAA-TLF1 and HAA-TLF2 being close to each other as well as HAA-TLF3 and HAA-TLF4 (Table 1; Supplementary Fig. S2). They all possess the Cys- and His-containing motifs and three of them have clear N-terminal extensions (absent in HAA-TLF2). While only HAA-TLF1 is predicted to be located in mitochondria, both HAA-TLF1 and HAA-TLF3 are found in our reference mitochondrial proteomes, although not in the set with the highest confidence. The HAA-TLF2 and HAA-TLF4 are found in another study where the contamination with chloroplastic proteins is more important. However, none of these proteins is found in the chloroKB database (Gloaguen *et al.*, 2017) raising questions about a mitochondrial-only or dual-targeted localization.

#### *Other putative Fe–S protein candidates and associated functions*

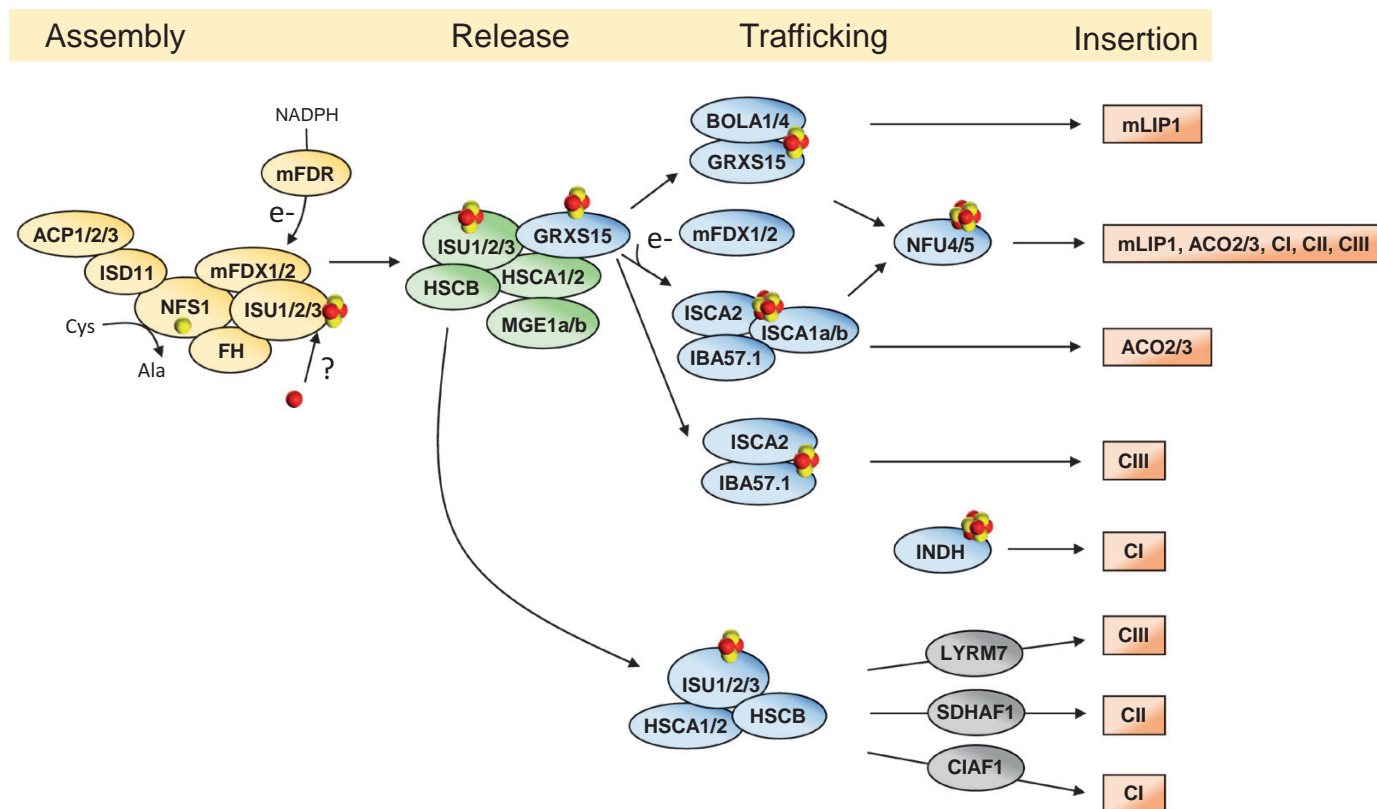
A few confirmed mitochondrial proteins have proven to bind Fe–S clusters upon expression in *E. coli*, but it is unclear whether their functions rely on the presence of an Fe–S cluster. This is the case of the MIA40 oxidoreductase, that participates in the oxidative folding of mitochondrial intermembrane space (IMS)-located proteins. This observation was made for Arabidopsis, yeast, and human orthologs (Spiller *et al.*, 2013; Murari *et al.*, 2015; Peleh *et al.*, 2017). This may be considered as an artifact of *E. coli* overexpression because there is no other known Fe–S protein in the IMS and this would question how the Fe–S cluster gets incorporated. At least, it indicates that the CxC motif is perfectly suited for Fe–S cluster binding by the *E. coli* machineries. The fact that iron binding is also documented in an *in vivo* homologous cellular context (Spiller *et al.*, 2013) is puzzling and may point to an additional function for this protein. Another recent example concerns the two mitochondrial thioredoxins *o* from Arabidopsis which were shown to bind a [4Fe–4S] cluster in a homodimer either as isolated from *E. coli* cells or upon *in vitro* Fe–S cluster reconstitution experiments (Zannini *et al.*, 2018). As the ligands of the Fe–S cluster are the Cys residues present in the CxxC motif that are responsible of the reductase activity of thioredoxins *o*, it was

proposed that the formation of the cluster might constitute a possible regulation mechanism by transiently inactivating the protein (Zannini *et al.*, 2018).

In this very last part, we briefly discuss a few additional cases for which the mitochondrial localization is unclear or highly uncertain, and we will not elaborate on their function. In animals, (mito)NEET proteins are localized to the outer membranes of mitochondria and play a role in the sensing and regulation of iron and reactive oxygen species (ROS) homeostasis (Golinelli-Cohen *et al.*, 2016). For this reason and because the seminal publication about this protein also suggested a mitochondrial localization, NEET is persistently referred to as a mitochondrial protein (Nechushtai *et al.*, 2012). However, Arabidopsis NEET seems primarily (or exclusively) located in plastid stroma (Su *et al.*, 2013) in accordance with its presence in numerous plastid proteomes and absence in mitochondrial proteomes. The RTEL1 (regulator of telomere elongation helicase 1) proteins are essential nuclear Fe–S proteins required for the maintenance of telomere integrity (Landry and Ding, 2014). The human RTEL1 possesses four Cys residues in its N-terminal domain for the binding of a [4Fe–4S] protein (Landry and Ding, 2014). Interestingly, these four Cys residues are conserved in the Arabidopsis RTEL1 ortholog, and Subacon predicts a mitochondrial localization probably because of the presence of an N-terminal extension constituted of hydrophobic and positively charged amino acids in the Arabidopsis RTEL1 polypeptide compared with the human counterpart (Przybyla-Toscano *et al.*, 2021). Because we have found one piece of evidence for its presence in a mitochondria proteome study, a dual targeting of this isoform remains a plausible working hypothesis (Table 1) (Heazlewood *et al.*, 2004). Finally, the last enzyme discussed is the ABCE2/RLI2 (ATP-binding cassette transporter subfamily E2, At4g19210) protein because it was detected in plant mitoproteomes (Table 1). The second member of this protein family in Arabidopsis, ABCE1 (At3g13640), is predicted to be cytosolic. ABCE proteins are implicated in ribosome biogenesis and recycling, and have been described to harbor two Fe–S clusters, one FDX-like [4Fe–4S] cluster and a unique ABCE-type [4Fe–4S] cluster. Seven Cys-coordinating residues have been identified by studying the proteins of *Sulfolobus solfataricus* and *Pyrococcus abyssi* (Barthelme *et al.*, 2007; Karcher *et al.*, 2008). The consensus CX<sub>4</sub>CX<sub>3</sub>CX<sub>3</sub>CP and CX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>3</sub>P sequences are found in both Arabidopsis ABCE isoforms, also suggesting an Fe–S cluster-dependent function for these enzymes in plants and possibly of ABCE2 in mitochondria.

## **Mitochondrial iron–sulfur cluster biogenesis**

The Fe–S cluster assembly process in mitochondria is ensured by the ISC protein machinery. This process can be divided into several steps (Fig. 3). The first one is the *de novo* synthesis of



**Fig. 3.** Model of the Fe-S cluster assembly machinery in plant mitochondria. This scheme, which uses the Arabidopsis protein nomenclature, is based on data acquired in Arabidopsis but also for a large part in yeast and human. Six proteins participate in the assembly complex forming a [2Fe-2S] cluster on the ISU1-ISU3 scaffold proteins. The [2Fe-2S] cluster of mFDX1/2 has not been represented to avoid confusion with that formed *de novo* on ISCU. According to the yeast and human models, the Fe-S cluster bound to ISU1-ISU3 would be released by the HSCA/HSCB chaperone/co-chaperone proteins primarily towards GRXS15 but also possibly towards respiratory complex subunits. The MGE1a/b proteins serve to exchange ADP bound to HSCA after ATP hydrolysis. LYR proteins (in gray) known to interact with the human HSCB ortholog and to contribute to the insertion of Fe-S subunits in the respiratory complexes are indicated. The conversion of a [2Fe-2S] cluster into a [4Fe-4S] cluster and their trafficking is ensured by various Fe-S cluster transfer proteins of the BOLA, INDH, IBA57, ISCA, and NFU families, forming different associations and maturation routes for the final insertion of the Fe-S cluster into specific client proteins. It is worth noting that the assembly step (complex composition, molecular mechanisms for Fe-S cluster assembly) is now quite well documented (except for the iron delivery step), whereas the Fe-S cluster conversion, trafficking, and insertion steps are far less well understood and described. The color code fits with the steps in which proteins are involved: *de novo* Fe-S cluster assembly, release, trafficking, and insertion into client apoproteins.

an Fe-S cluster on so-called scaffold proteins. Importantly, the process requires iron atoms, and Cys that provides sulfur atoms. For more information about iron transport or Cys synthesis and use in mitochondrion, we direct the reader to the reviews by Romero *et al.* (2014) and Vigani *et al.* (2019). In a second step, the pre-formed cluster is released and transferred with the help of chaperones either to recipient apoproteins (respiratory complex subunits) as suggested by recent studies (see below) or to a central glutaredoxin (GRX). As a third step, the trafficking and conversion of the pre-formed Fe-S cluster is achieved by so-called Fe-S cluster carrier or transfer proteins. Finally, the Fe-S cluster is delivered and inserted into specific client proteins. In the following parts, we will describe the knowledge gained on the molecular mechanisms associated with the functioning of this machinery from studies conducted in plants and consequently we use the plant gene/protein nomenclature. However, they will be implemented with those obtained in

other eukaryotes (notably yeast and human) when information is missing. Since the gene/protein nomenclature is sometimes different between organisms, we have provided a table presenting the correspondences (Supplementary Table S1).

#### *De novo synthesis of a [2Fe-2S] cluster on ISU scaffold proteins*

The *de novo* synthesis of Fe-S clusters in mitochondria requires an early assembly complex formed by at least seven proteins [NFS1, ISD11, ACP1/2/3, ISU1/2/3, FH (frataxin, FXN), mFDX1/2, and mFDR]. They act in the concerted assembly of iron and sulfur atoms on ISU scaffold proteins in the form of a [2Fe-2S] cluster. Studies performed using human proteins indicate that a core assembly complex is formed between the pyridoxal phosphate (PLP)-dependent cysteine desulfurase NFS1, the LYRM (Leu-Tyr-Arg motif) family protein ISD11,

Locus ID	Gene name	Transcript abundance									mRNA decay 1/2 time (hour)	Protein copies / mitochondrion	Protein decay 1/2 time (day)
		Root	Stem	Seedling	Leaf	Meristem	Flower	Pollen	Silique	Seed			
At5g65720	NFS1										4.2	4265	4.4
At5g61220	ISD11										11.2	825	14.9
At2g44620	ACP1										14.4	..	11.7
At1g65290	ACP2										14.0	1215	9.2
At5g47630	ACP3										7.4	28	..
At4g05450	mFDX1										0.9	73	..
At4g21090	mFDX2										1.6	494	..
At4g32360	mFDR										2.2	83	..
At4g03240	FH										11.4	417	10.4
At4g22220	ISU1										27.0	927	..
At3g01020	ISU2										9.8	..	..
At4g04080	ISU3										..	..	..
At4g37910	HSCA1										6.0	4909	2.9
At5g09590	HSCA2										5.9	..	10.9
At5g06410	HSCB										2.3	86	..
At4g26780	MGE1a										2.4	1075	37.3
At5g55200	MGE1b										7.8	393	2.7
At3g15660	GRXS15										9.1	1268	4.5
At1g55805	BOLA1										4.0	88	..
At5g17560	BOLA4										12.9	102	..
At2g16710	ISCA1a										5.6	346	1.9
At2g36260	ISCA1b										..	..	..
At5g03905	ISCA2										4.4	324	..
At4g12130	IBA57.1										5.0	499	16.4
At3g20970	NFU4										2.4	444	3.9
At1g51390	NFU5										4.8	185	3.5
At4g19540	INDH										2.2	137	..

**Fig. 4.** Transcript abundance per organ, protein copies per mitochondrion, and mRNA and protein decay rate for mitochondrial ISC maturation factors. The origin and normalization of the results are exactly as in Fig. 2.

and an acyl carrier protein (ACP) (Boniecki *et al.*, 2017; Cory *et al.*, 2017). The ISD11 protein plays a stabilizing role for NFS1 (Adam *et al.*, 2006). By providing fatty acid precursors, notably required by type II fatty acid synthases for lipoic acid biosynthesis, ACPs link Fe-S cluster synthesis with mitochondrial lipid synthesis and cellular energy status (Van Vranken *et al.*, 2016). The protein copies per mitochondria seem to differ considerably, with NFS1 being much more abundant than ISD11 and ACPs (Fig. 4). However, this may be compensated by the higher transcript stability and protein half-life of ISD11 and ACPs. This core ISC complex associates transiently with other assembly proteins, ISU, frataxin (FXN/FH), and mFDX. It was recently shown using non-plant proteins that the process of sulfide production is tightly coordinated with iron entry. Iron binding to mammalian ISCU2 drives persulfide uptake from NFS1 and allows persulfide reduction by FDX2 (Webert *et al.*, 2014; Gervason *et al.*, 2019). The interaction between the yeast

reduced FDX, Yah1, and Isu1 was detailed up to the structural level (Webert *et al.*, 2014). How iron is brought to ISU proteins is still an open question, but we assume that this should rely on an iron chaperone protein/system to obtain a specificity that would hardly be achieved using iron-chelated forms such as organic acid-bound iron forms present in plant cells. Despite this has been long debated, what seems now clearer is that FXN is not required for iron insertion in apo-ISCU as shown with mouse proteins (Gervason *et al.*, 2019). In fact, there was no iron bound to purified mouse FXN (Gervason *et al.*, 2019). The recent biochemical and structural evidence indicate that FXN stimulates the whole process by stabilizing the conformation of key loops of NFS1 present at the NFS1-ISCU2 interface (Fox *et al.*, 2019), thus accelerating persulfide transfer from NFS1 to ISCU2 which is the rate-limiting step, whereas the step of persulfide formation on NFS1 is not affected (Parent *et al.*, 2015; Gervason *et al.*, 2019). Residues making contacts

between proteins of this dynamic supercomplex have been identified via these structural studies and they are globally conserved in the Arabidopsis counterparts, suggesting that the plant assembly complex should be similar. This is recapitulated in the amino acid sequence alignments shown in [Supplementary Fig. S3](#) but not developed here.

NFS1 provides the sulfur atoms needed for Fe–S cluster formation on ISU proteins via its cysteine desulfurase activity ([Frazzon et al., 2007](#)). There is no structural information yet for the plant recombinant protein, which had to be purified under denaturing conditions and renatured in the presence of PLP to obtain a folded and active protein ([Turowski et al., 2012](#)). Very probably, it would be mandatory to co-express it with ISD11 as this protein is known to stabilize the yeast Nfs1 protein, that is otherwise prone to aggregation ([Adam et al., 2006](#)). As a class I cysteine desulfurase, a persulfidated Cys should be formed on an exposed loop after each catalytic cycle and the sulfur atom transferred to ISUs. The NFS1 protein is essential in *A. thaliana*, as demonstrated by the inability to obtain knockout plants ([Frazzon et al., 2007](#)). Using viable antisense or *nfs1-1/nfs1-2* homozygous and hemizygous knockdown lines, the latter showing delayed germination, it was possible to show that the activity of SDH but also of cytosolic aldehyde oxidases and ACO is decreased, thus confirming that the mitochondrial cysteine desulfurase is also the source of sulfur for cytosolic Fe–S proteins in plants as in other organisms ([Frazzon et al., 2007](#); [Bernard et al., 2013](#); [Armas et al., 2019](#)). Interestingly, the transcript levels of *ISD11* and *FH* but not *ISU1* were decreased in the *nfs1-1* and *nfs1-2* homozygous knockdown lines, while all these transcripts were increased in overexpressing lines ([Armas et al., 2019](#)). This demonstrates a concerted transcriptional regulation of the genes coding for proteins of this early assembly complex in this species. Such regulation is less obvious when analyzing the transcript co-expression in various plant organs of genes coding for protein couples that are known to interact ([Supplementary Fig. S4](#)). Still, an interesting transcriptional co-regulation is visible for *ISD11* and the three *ACP* genes.

A persistent, controversial question is associated with the detected mitochondrial localization of SUFE1 using green fluorescent protein (GFP) fusions and interaction with NFS1 using binary yeast two-hybrid and *in planta* bimolecular fluorescence complementation (BiFC; [Xu and Möller, 2006](#)). Indeed, SUFE1 is part of the chloroplastic SUF machinery and interacts with the class 2 cysteine desulfurase, NFS2, the catalytic Cys of which is less accessible than in class I cysteine desulfurases ([Ye et al., 2006](#); [Roret et al., 2014](#)). However, considering the recent structural details describing the interaction of human NFS1 with its partner proteins ([Cory et al., 2017](#); [Boniecki et al., 2017](#); [Fox et al., 2019](#)), it seems very unlikely that SUFE1 has a role in the mitochondrial ISC machinery. Hence, we presume at this stage that the cellular observation of the NFS1–SUFE1 interaction may actually represent an artifact possibly linked to the over- and co-expression of the proteins. As an additional

proof, it is worth mentioning that SUFE1 was only present in the mitochondrial proteome study where many chloroplastic proteins are found ([Fuchs et al., 2020](#)), but not in that obtained with highly pure mitochondria ([Niehaus et al., 2020](#)) where all other early-acting maturation factors are present.

Concerning ISD11 and ACPs, biochemical evidence of their interactions with NFS1 is currently lacking in the plant context. However, gene expression analysis under abiotic stress showed that *ISD11* expression, as well as that of other ISC components, is significantly modified under iron depletion/excess in *Oryza sativa* and *Prunus persica* ([Liang et al., 2014](#); [Song et al., 2014](#)). In the same way, a correlation between the expression pattern of *NFS1* and *ISD11* has been revealed in soybean, reinforcing their common implication in the ISC system ([Heis et al., 2011](#)). The effect of modifying *ISD11* expression in plants has also not been described. In yeast, a *Disd11* mutant is lethal, but a conditional strain exhibits the expected defects in the accumulation and/or activity of Fe–S proteins (SDH, aconitase, and Rieske protein of complex III) ([Adam et al., 2006](#)). In Arabidopsis, eight genes encode ACP isoforms, five are plastidial (pACP1–pACP5) and three are mitochondrial (mACP1–mACP3) ([Meyer et al., 2007](#); [Fu et al., 2020](#)). The *macp1* (At2g44620), *macp2* (At1g65290), and *macp3* (At5g47630) single mutants have no discernible growth phenotype, whereas a triple mutant is embryo-lethal ([Table 2](#)) ([Fu et al., 2020](#)). Among double mutant combinations, only the *macp1 macp2* double mutant displayed severe growth and bolting retardation, and this is partially reversed when the mutant is grown in non-photorespiratory conditions or in the presence of sucrose. This seems consistent with the fact that both genes are expressed at high levels as compared with *mACP3* ([Fig. 4](#)). The connection with protein lipoylation was evident from reduced levels of lipoylated mitochondrial proteins and hyperaccumulation of Gly as a result of GDC defects. On another note, there is no evidence so far that plant mACPs are part of respiratory complex I as demonstrated for the bovine and *Neurospora crassa* proteins ([Meyer et al., 2007](#)).

The building of an Fe–S cluster on ISUs involves the transfer and reduction of the sulfur atoms from the persulfidated catalytic Cys of NFS1 together with the introduction of iron atoms. As already mentioned, this requires the reductase activity of an FDX as shown for yeast and human proteins and the regulatory function of frataxin, which interacts with NFS1 and ISCU ([Webert et al., 2014](#); [Fox et al., 2019](#); [Gervason et al., 2019](#)). Excluding the atypical mFDX-like mentioned earlier, there are two regular mFDXs, mFDX1 and mFDX2, in Arabidopsis which are closer to human FDX2, and a single NADPH-dependent mFDR thought to reduce both mFDXs ([Picciocchi et al., 2003](#)). Their role in Fe–S cluster biogenesis has never been explored so far, perhaps in part because of their described essential nature for gametophyte formation ([Pagnussat et al., 2005](#); [Boavida et al., 2009](#)). Surprisingly, pollen is the organ where both genes are the least expressed ([Fig. 4](#)). The transcript expression pattern and protein copy number

suggest that mFDX2 may be the primary regular mFDX, although perhaps not in roots.

In the yeast and human ISC early-assembly complex, frataxin interacts with both NFS1 and ISCU proteins, but it does not bind to ISCU without NFS1 (Schmucker *et al.*, 2011; Gakh *et al.*, 2016; Fox *et al.*, 2019; Gervason *et al.*, 2019). Similar functions of Arabidopsis frataxin are assumed based on its capacity to restore the growth phenotype of the  $\Delta yfh$  yeast strain (Busi *et al.*, 2004). The Arabidopsis loss-of-function (*fhi*) mutants are embryo-lethal, indicating that AtFH is essential (Table 2) (Busi *et al.*, 2006). Knockdown lines for *AtFH* have decreased ACO and SDH activities (Busi *et al.*, 2006; Vazzola *et al.*, 2007). The Arabidopsis FH stimulates NFS1 activity by a factor of 50, corroborating the effects seen for human proteins in an assay examining the Fe–S cluster assembly on ISCU2 (Turowski *et al.*, 2012; Gervason *et al.*, 2019).

In Arabidopsis, three ISU sequences, referred to as AtISU1–AtISU3, show similarities with both eukaryotic and prokaryotic Isu/ISCU homologs, and possess the three conserved cysteinyl residues required for Fe–S cluster binding (Tone *et al.*, 2004; Léon *et al.*, 2005). Expression of *AtISU1–AtISU3* in various yeast mutant backgrounds, harboring mutations or deletion in the yeast *Isu1* gene, showed that all three proteins are functional substitutes (Tone *et al.*, 2004; Léon *et al.*, 2005). The mitochondrial localization of Arabidopsis ISU1–ISU3 has been confirmed, using both immunodetection and GFP-tagged proteins (Léon *et al.*, 2005). The *AtISU1* gene is constitutively expressed in all tissues, whereas *AtISU2* and *AtISU3* genes are much less expressed and exhibit more specific expression patterns, with an expression almost restricted to pollen (Fig. 4) (Tone *et al.*, 2004; Frazzon *et al.*, 2007). Antisense or RNAi lines for these genes result in reduced plant growth and a bushy phenotype due to an increase in axillary shoot development (Table 2) (Frazzon *et al.*, 2007).

#### *The release of a [2Fe–2S] cluster from ISU scaffold proteins*

Once a [2Fe–2S] cluster is synthesized on ISU1–ISU3, this cofactor must be properly transferred to other apoproteins. This might be final client proteins as proposed for some complex I, II, or III subunits or GRXS15 (Fig. 3). In both cases, the chaperone/co-chaperone proteins, HSCA and HSCB (Ssq1 and Jac1 in yeast or HSPA9 and HSC20 in human), are likely to play an important role in this process by facilitating the dissociation and transfer of the Fe–S cluster to the partner protein. In the yeast system, the transition from the assembly step (Isu1 bound to Nfs1 and Yfh1 frataxin) to the transfer step (Isu1 bound to Ssq1 and Jac1) is well detailed at the molecular level. The binding regions of Nfs1 and Yfh1 on Isu1 overlap with those of Jac1 and Ssq1, respectively, thus preventing the binding of the latter proteins before the Fe–S cluster is synthesized (Majewska *et al.*, 2013; Manicki *et al.*, 2014). During this step, Isu1 interacts with Ssq1 via its hydrophobic peptide-binding motif LPPVK

(same region as for interaction with Yfh1), whereas the interaction with Jac1 involves the L63, V72, and F93 residues on the Isu1 side and L162, M166, and Y220 residues on the Jac1 side (Dutkiewicz *et al.*, 2004; Fox *et al.*, 2019). These residues are conserved in Arabidopsis orthologs (Supplementary Fig. S3).

Concerning the next step, human HSC20 (ortholog of yeast Jac1) was demonstrated to physically interact, via its C-terminal domain, with the LYR tripeptide contained either in final apo-recipient proteins (i.e. SDHB) or in some complex II (LYRM8/ACN9) and III (LYRM7) assembly factors (Maio *et al.*, 2014, 2016, 2017). These interactions appear to constitute a sufficient basis for substrate discrimination. These assembly factors are usually used to facilitate cofactor or subunit insertion in mitochondrial respiratory complexes and to prevent or mitigate unwanted reactions during biogenesis (Maio *et al.*, 2014). The orthologs of human LYRM8 and ACN9 in yeast, Sdh6 and Sdh7, are proposed to protect the Fe–S cluster(s) of Sdh2 during its maturation from the deleterious effects of ROS (Na *et al.*, 2014). Orthologs of LYRM8/Sdh6 and ACN9/Sdh7, referred to as SDHAF1 and SDHAF3, are encoded by the Arabidopsis genome, but their functions have not yet been investigated (Meyer *et al.*, 2019). Concerning complex III, Fe–S cluster incorporation is the last step to produce a fully functional complex. It was demonstrated that a LYR protein, Mzm1 in yeast or LYRM7 in human, is an assembly factor for the Rieske Fe–S subunit, stabilizing it prior to the translocation step (Atkinson *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2012). Again, a LYRM7 ortholog is present in Arabidopsis (Ivanova *et al.*, 2019). In total, there are 10 LYRM members in Arabidopsis, including ISD11, 12 in human, but only 5 in yeast (Ivanova *et al.*, 2019; Lill and Freibert, 2020). An Arabidopsis LYRM member, CIAF1, was recently shown to participate in complex I assembly by interacting with the TYKY Fe–S subunit (Ivanova *et al.*, 2019). However, LYRM proteins may have functions unrelated to Fe–S cluster assembly/delivery, being for instance important for the assembly of complex V (FMC1) (Lefebvre-Legendre *et al.*, 2001) or of the mitoribosome (Dibley *et al.*, 2020). So far, no connection was made between LYRM and HSCB proteins in plants, but a strong transcriptional regulation is observed between LYRM7 and HSCB (Supplementary Fig. S4).

If not recruiting LYR proteins, yeast Jac1 associates with holo-Isu1 and recruits the Ssq1 chaperone which then binds Grx5 to allow dissociation and transfer of this newly synthesized Fe–S cluster, but the contacting residues are as yet unknown (Uzarska *et al.*, 2013). It is noteworthy that Grx5 binding does not stimulate the ATPase activity of Ssq1, unlike Jac1 or Isu1 (Uzarska *et al.*, 2013). Arabidopsis possesses two mitochondrial HSP70 proteins, AtHSCA1 (alias MTHSC70-1) and AtHSCA2 (alias MTHSC70-2), and one HSCB. Both HSCA1 and HSCA2 possess an ATP hydrolysis activity that is stimulated by the presence of HSCB and ISU1 (Xu *et al.*, 2009; Leaden *et al.*, 2014), as observed for yeast counterparts (Dutkiewicz *et al.*, 2003). It is likely but not yet proven that MGE1 proteins, that are involved in nucleotide exchange (ATP reloading

on the HSP70 chaperone) at this step in yeast, are also required for the correct functioning of the plant ISC machinery (Dutkiewicz *et al.*, 2006). Arabidopsis *HSCB* and *HSCA1* were reported to complement the respective yeast  $\Delta jac1$  and  $\Delta ssq1$  mutants (Xu *et al.*, 2009), which suggests similar roles for these proteins in Fe–S cluster biogenesis in plants. Arabidopsis mutant lines have been isolated for these three genes. Different *hscB* knockdown lines show drastically reduced ACO and SDH activities (Xu *et al.*, 2009; Leaden *et al.*, 2016) and, in the most severe allele, a reduced seed set, a waxless phenotype, and inappropriate trichome development were observed (Xu *et al.*, 2009). A mutant for *HSCA2* has no growth phenotype under standard conditions (Wei *et al.*, 2019). In contrast, severe growth defects (shorter roots and stems and smaller rosettes) were observed in *A. thaliana mtHSC70-1/hscA1* knockout lines (Wei *et al.*, 2019). At the molecular level, this resulted in abnormal mitochondria and altered respiration caused by reduction in the complex IV level and activity, as well as by the activation of the alternative oxidase pathway and by increased ROS levels (Wei *et al.*, 2019). Surprisingly, the activity of complex II is not affected while it is in *hscB* knockdown lines (Leaden *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2019). As HSCAs probably have a general role in protein import/folding, it may be difficult to dissociate which effects are linked to a defect in Fe–S cluster biogenesis, a function for which HSCA1 and HSCA2 could be redundant. Interestingly, HSCA1 is the protein with by far the highest protein copy number among ISC components together with NFS1 (Fig. 4).

As the sole class II GRX member present in plant mitochondria, it is expected that GRXS15 possesses functions similar to those of yeast and human orthologs and is likely to be the dedicated Fe–S cluster transfer protein accepting the [2Fe–2S] clusters assembled on ISU1–ISU3 in plants. Accordingly, AtGRXS15 bridges a [2Fe–2S] cluster in a homodimer very probably using one Cys of each monomer and two glutathione (GSH) molecules as ligands, as described for other class II GRXs (Moseler *et al.*, 2015). However, both Arabidopsis and poplar GRXS15 do not or poorly complement the defects of the yeast  $\Delta grx5$  mutant (Bandyopadhyay *et al.*, 2008; Moseler *et al.*, 2015). Although molecular explanations are lacking, we assume that this is because of their inability to interact with some of the yeast Grx5 partners. Among noticeable sequence variations, GRXS15, but also *T. brucei* 1-C-Grx1 which is unable to complement the yeast mutant (Filser *et al.*, 2008), exhibit an N-terminal extension of ~25 residues which is absent in human and yeast orthologs.

Unlike the situation in yeast, Arabidopsis *grxs15* null mutants are embryo-lethal, indicating an essential role for plant viability (Moseler *et al.*, 2015). Therefore, it can be hypothesized that GRXS15 fulfills additional functions. Using a GRXS15 variant (bearing a K83A mutation) with diminished GSH and Fe–S cluster content which only partially complemented the *grxs15* knockout lines, a decrease in ACO activity was observed as expected. The study of RNAi knockdown lines for GRXS15

also pointed to a specific defect in lipoic acid synthesis (Ströher *et al.*, 2016). These findings suggest that GRXS15 may not be the hub protein required for both ISC and CIA functioning as in yeast (Uzarska *et al.*, 2013), but may only be involved in the maturation of a specific set of mitochondrial Fe–S proteins, thus creating an important difference with the situation in yeast.

#### Conversion of [2Fe–2S] to [4Fe–4S] clusters: the essential role of GRXS15

Concerning the downstream cluster transfer from GRXS15 to recipient apoproteins, the current view in yeast and human is that the GRXS15 orthologs are required for the maturation of both [2Fe–2S] and [4Fe–4S] proteins in mitochondria but are also required for the maturation of cytosolic and nuclear Fe–S proteins via their contribution to the mitochondrial ISC export system (Berndt *et al.*, 2020; Lill and Freibert, 2020). As other late-acting Fe–S cluster transfer proteins (ISCAs, NFUs, and INDH/NUBPLs) are in principle unable to receive their cluster from ISUs, GRX5 seems indispensable in order to carry out the maturation of [4Fe–4S] proteins. According to such a central position, GRXS15 is the protein with the highest copy number among Fe–S cluster transfer proteins (Fig. 4). The immediate Fe–S cluster acceptors of GRXS15 are likely to be the A-type carrier (ATC) proteins, ISCAs, which are required for the maturation of [4Fe–4S] proteins with the assistance of IBA57 proteins but not of [2Fe–2S] proteins, as shown from studies using yeast and human cell lines (Gelling *et al.*, 2008; Mühlhoff *et al.*, 2011; Sheffel *et al.*, 2012). Accordingly, evidence obtained using Arabidopsis and human proteins indicate that an ISCA1–ISCA2 heterodimeric complex incorporates a [4Fe–4S] cluster by reductive coupling from two [2Fe–2S] clusters bound to GRXS15/GLRX5 (Brancaccio *et al.*, 2014; Azam *et al.*, 2020a). However, several uncertainties about the molecular relationship between all these proteins exist. Indeed, *in vivo* and *in vitro* studies indicated that, in animals, ISCA2, but not ISCA1, interacts with IBA57 (Beilschmidt *et al.*, 2017), whereas in yeast both Isa1 and Isa2 proteins interact with Iba57 (Mühlhoff *et al.*, 2011). Moreover, studies performed *in vitro* using both human and Arabidopsis proteins indicated that IBA57 is not required *per se* for the assembly of [4Fe–4S] clusters on ISCA proteins (Brancaccio *et al.*, 2014; Azam *et al.*, 2020b) but seems important in the case where a human FDX2 is used as an electron donor (Weiler *et al.*, 2020). Altogether, these results indicate that IBA57 is involved in [4Fe–4S] cluster assembly by promoting electron entry in the system but not by binding the Fe–S cluster. It may also serve for cluster release towards client proteins, including [2Fe–2S] proteins, as additionally suggested by the reported decreased expression and maturation of the Rieske protein present in complex III in a  $\Delta iba57$  mutant (Sánchez *et al.*, 2019) and the observation that human ISCA2 and IBA57 can form a [2Fe–2S] cluster-bound heterocomplex *in vitro* (Gourdoupis *et al.*, 2018).

Arabidopsis possesses two IBA57 and four ATC proteins (Couturier *et al.*, 2013). IBA57.2 and SUFA1 are localized in plastids and probably belong to the SUF machinery, whereas IBA57.1 and the other three ATC members (i.e. ISCA1a, ISCA1b, and ISCA2) are (or are predicted to be) present in mitochondria (Yabe and Nakai, 2006; Waller *et al.*, 2012). The Arabidopsis ISCA1a and ISCA1b are the orthologs of yeast *Isa1* and human ISCA1, whereas Arabidopsis ISCA2 is the ortholog of yeast *Isa2* and human ISCA2. Yeast complementation studies showed that the expression of Arabidopsis ISCA1a and ISCA1b or of ISCA2 complemented the  $\Delta isa1$  or  $\Delta isa2$  phenotypes, respectively, and that the co-expression of both ISCA1 and ISCA2 isoforms rescued the  $\Delta isa1 isa2$  phenotypes, indicating that they probably function as ISCA1–ISCA2 heterodimers as well (Uzarska *et al.*, 2018). Concerning IBA57, expression of Arabidopsis IBA57.1 also complemented the corresponding yeast  $\Delta iba57$  mutant (Uzarska *et al.*, 2018), in addition to complementing the hypersensitivity to oxidative stress and poor growth on minimal media of the *E. coli* *ygfZ* mutant and to rescue the defect in MiaB activity (Waller *et al.*, 2010, 2012). The fact that Arabidopsis IBA57.1 can functionally replace *E. coli* *YgfZ*, which was shown to binds folate *in vitro* (Waller *et al.*, 2010), suggests that Arabidopsis IBA57.1 requires folate for its function even though the underlying molecular mechanism is unknown. Overall, this demonstrates that the individual functions of the mitochondrial ISCA and IBA57 proteins seem to be evolutionarily conserved and raises further questions about why this is not the case for GRXS15. No Arabidopsis mutant has been described so far for ATC genes, whereas a knockout mutant for *IBA57.1* is embryolethal (Waller *et al.*, 2012). Thus, it is tempting to speculate that *isca* mutants should be lethal as well, but this will have to be experimentally addressed.

In addition to ISCA proteins, other known GRX partners are the BOLA proteins. The human mitochondrial BOLA1 and BOLA3 proteins bind a single [2Fe–2S] cluster into a heterodimer with GRX5 (Uzarska *et al.*, 2016; Nasta *et al.*, 2017). However, in yeast, the mitochondrial Bol1 and Bol3 proteins seem to be only required for the maturation of [4Fe–4S] proteins, pointing to the existence of still missing steps (Uzarska *et al.*, 2016). It is possible that the Fe–S cluster bridged by GRX–BOLA heterodimers uniquely serves for the formation a [4Fe–4S] cluster on ISCA or NFU1 proteins by reductive coupling (see below) but does not transfer [2Fe–2S] cluster to [2Fe–2S] cluster-containing proteins and that the latter function is only ensured by GRX homodimers (Fig. 3). In a binary yeast two-hybrid experiment, the Arabidopsis GRXS15 was shown to interact with all three BOLA proteins, regardless of their subcellular localizations (Couturier *et al.*, 2014). Using transient expression of BOLA–GFP fusions in tobacco cells, a mitochondrial (and plastidial) localization was experimentally confirmed only for Arabidopsis BOLA4 (Couturier *et al.*, 2014). However, Arabidopsis BOLA1, which was uniquely found in plastids upon transient expression in tobacco leaves, has

been repeatedly found in mitochondrial proteomes including that recently reported from highly pure mitochondria (Table 1) (Niehaus *et al.*, 2020). Therefore, we consider it as a likely ISC maturation factor. A GRXS15–BOLA4 interaction was observed *in planta* using BiFC (Couturier *et al.*, 2014). The details of the regions and residues involved in GRX–BOLA protein–protein interactions have been already recapitulated in Przybyla-Toscano *et al.* (2017). Hence, it is now necessary to analyze Arabidopsis mutant lines modified for the expression of these BOLA genes to determine their roles and to what extent the phenotypes are similar to those of *grxs15* mutants. Both BOLA1 and BOLA4 complement at least partially the defects of the yeast  $\Delta bol1-bol3$  double mutant, notably the diminished activity of lipoic acid-dependent PDH and KGDH (Uzarska *et al.*, 2018).

#### Trafficking and insertion of [4Fe–4S] clusters

Currently less is known about the physiological roles and partners of other late-acting maturation factors, namely NifU-like proteins (NFUs) and INDH, which are known assemblers of [4Fe–4S] clusters. *In vivo* and *in vitro* studies indicated that yeast and human NFU1 are required for the trafficking of [4Fe–4S] proteins but not of [2Fe–2S] proteins (Cameron *et al.*, 2011; Navarro-Sastre *et al.*, 2011; Melber *et al.*, 2016). Both patient cells with mutations in *NFU1* and yeast  $\Delta nfu1$  mutant cells have diminished protein lipoylation levels, indicating that lipoate synthase is a primary target of NFU1 (Navarro-Sastre *et al.*, 2011). Until recently, the current model indicated that NFU1 should receive its Fe–S cluster from an ISCA1/2 heterocomplex (Melber *et al.*, 2016), but it was recently described that the reductive coupling of two [2Fe–2S] clusters bound to a human GLRX5–BOLA3 heterodimer allows the reconstitution of a [4Fe–4S] cluster on apo-NFU1 (Nasta *et al.*, 2020). The presence of BOLA3 was mandatory as there was no cluster formation on NFU1 from a [2Fe–2S] cluster-bound GLRX5 homodimer. This observation is consistent with the previously described interaction of BOLA3 and NFU1 (Uzarska *et al.*, 2016) but also with the similar impairment of lipoic acid-dependent 2-oxoacid dehydrogenases arising from defective lipoate synthesis and defects in respiratory complexes I and II that were observed in human patients affected in the *IBA57*, *ISCA2*, *NFU1*, and *BOLA3* genes together referred to as the multiple mitochondria dysfunctions syndrome (Lebigot *et al.*, 2017). It is noteworthy that a transcriptional co-regulation is visible between Arabidopsis *NFU4/5* and *BOLA4* genes, giving support to a possible interaction (Supplementary Fig. S4).

Overall, this suggests the existence of at least two alternative and independent pathways for the delivery of [4Fe–4S] clusters to NFU4/5 (Fig. 3). This observation may help to explain why the yeast  $\Delta nfu1$  mutant does not exhibit all defects observed in yeast cells lacking the *Isa1/2* complex such as the Glu and Lys auxotrophies associated with defects in the maturation



of the [4Fe–4S] cluster-containing proteins, Aco2 and the homoaconitase Lys4 (Mühlenhoff *et al.*, 2011). The Arabidopsis NFU4 and NFU5 orthologs are localized in mitochondria, as evidenced from the expression of NFU4–GFP fusions in Arabidopsis protoplasts (Léon *et al.*, 2003) or from the presence of NFU5 in plant mitochondrial proteomes (Table 1). It should be noted that it was recently shown that reduction of an intramolecular disulfide formed between NFU4/5 Cys ligands by Arabidopsis mitochondrial thioredoxin *o* should make them competent for Fe–S cluster trafficking (Zannini *et al.*, 2018). We have recently observed that both Arabidopsis NFU4 and NFU5 bind one [4Fe–4S] cluster per homodimer upon *in vitro* Fe–S cluster reconstitution, but they can also receive their Fe–S cluster from an ISCA1a/2 heterodimer (Azam *et al.*, 2020b). All [4Fe–4S] cluster-bound ISCA1a/2, NFU4, and NFU5 forms are effective cluster donors for the maturation of the mitochondrial apo-aconitase 2, suggesting a physiological redundancy for this target (Fig. 3) (Azam *et al.*, 2020b). However, the consequences of NFU4 and NFU5 deletion in Arabidopsis await characterization. Recent complementation studies of the yeast *Δnfu1* mutant with both Arabidopsis NFU4 and NFU5 indicated that both are functional substitutes (Uzarska *et al.*, 2018).

Concerning NUBPL/Ind1, their mutation in human or depletion in *Yarrowia lipolytica* leads to a specific decrease in complex I activity (Bych *et al.*, 2008; Sheftel *et al.*, 2009; Calvo *et al.*, 2010). As these proteins incorporate a [4Fe–4S] cluster upon *in vitro* Fe–S cluster reconstitution experiments (Bych *et al.*, 2008; Sheftel *et al.*, 2009), this suggests a requirement for the maturation of one or several [4Fe–4S] clusters present in complex I. However, there is no evidence yet of the acquisition route(s) of the Fe–S cluster by Ind1 proteins. Arabidopsis *indh* mutants are lethal at the seedling stage (Wydro *et al.*, 2013). After transferring the *indh* seedlings from sucrose-supplemented medium to soil, plants bolted and produced seeds, although with some delay. The *indh* inflorescences were highly branched and smaller as compared with wild-type plants, and pollen viability was impaired. This pointed to the importance of INDH for plant growth and development, contributing both at the early vegetative and reproductive stages. As in *Yarrowia* and human, the assembly and activity of complex I were impaired in the Arabidopsis *indh* mutant, while other respiratory complexes seem to be unaffected (Wydro *et al.*, 2013). The mutant accumulates a 650 kDa subcomplex that probably corresponds to the membrane arm of complex I lacking the N-module that contains Fe–S cluster-binding subunits (Schimmeyer *et al.*, 2016). However, a direct role for INDH in Fe–S cluster maturation was questioned, notably because a delay in complex I re-assembly upon INDH expression was indicative of a translation defect (Wydro *et al.*, 2013). While further studies will be required to delineate the exact molecular role of INDH, it is tempting to speculate that the observed translation defect is linked to the defective Fe–S cluster maturation of the putative mitochondrial tRNA modifying radical SAM enzymes.

## Conclusions

The functions of the mitochondrial Fe–S proteins are often essential as they are involved, for instance, in respiration or in the biosynthesis of protein cofactors. A few novel Fe–S proteins are regularly identified, as exemplified by this updated literature survey. The maturation of the Fe–S clusters present in mitochondrial proteins relies on a conserved multiprotein assembly machinery. The early assembly steps are also required for the maturation of extra-mitochondrial proteins and, as a consequence, these maturation factors are essential for plant growth and development. What is more unexpected, if we compare this with the situation in yeast, is that late-acting maturation factors, specific to mitochondrial proteins, are also essential in plants. This may be due not only to the existence of more tubular, less redundant maturation pathways, at least for some essential Fe–S proteins, but also to the fact that cofactors synthesized in mitochondria, such as MoCo or biotin, are used by proteins present in other subcellular compartments. More generally, knowledge about the Fe–S cluster assembly routes employed by each Fe–S protein and about how protein–protein interaction specificities are achieved to get ~40 Fe–S proteins properly matured using <10 Fe–S cluster donors are lacking in plants as in other organisms. Hence, this should, in particular, be the focus of intense research in the future.

## Supplementary data

The following supplementary data are available at [JXB online](#).

Table S1. Components of the ISC machinery in *Arabidopsis thaliana* and orthologs in yeast and human.

Fig. S1. Amino acid sequence alignment of Arabidopsis mitochondrial FDXs.

Fig. S2. Amino acid sequence alignment of Arabidopsis thioredoxin ferredoxin-like proteins.

Fig. S3. Amino acid sequence alignments of components of the early-acting ISC assembly complex from model eukaryotes, highlighting the conservation of contacting residues.

Fig. S4. Correlation of the transcript abundance in Arabidopsis organs, for known interactants of the ISC machinery.

## Acknowledgements

NR acknowledges the French Programme Investissement d'Avenir (PIA) 'Lorraine Université d'Excellence' (reference no. ANR-15-IDEX-04-LUE) and the French National Research Agency (ANR-18-CE92-0016-01) for the partial financial support of the work on Fe–S protein maturation. OK wishes to thank the KEMPE Foundations as well as TC4F for their financial support. The UMR1136 is supported by a grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the 'Investissements d'Avenir' program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE).

## Author contributions

All authors have contributed to data compilation and writing.

## Data availability

All data supporting the findings of this study are available within the paper and within its supplementary data published online.

## References

- Adam AC, Bornhövd C, Prokisch H, Neupert W, Hell K. 2006. The Nfs1 interacting protein Lsd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *The EMBO Journal* **25**, 174–183.
- Alban C, Job D, Douce R. 2000. Biotin metabolism in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 17–47.
- Anton BP, Saleh L, Benner JS, Raleigh EA, Kasif S, Roberts RJ. 2008. RimO, a MiaB-like enzyme, methylthiolates the universally conserved Asp88 residue of ribosomal protein S12 in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **105**, 1826–1831.
- Araújo WL, Ishizaki K, Nunes-Nesi A, *et al.* 2010. Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of Arabidopsis mitochondria. *The Plant Cell* **22**, 1549–1563.
- Araújo WL, Ishizaki K, Nunes-Nesi A, *et al.* 2011a. Analysis of a range of catabolic mutants provides evidence that phytanoyl-coenzyme A does not act as a substrate of the electron-transfer flavoprotein/electron-transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase complex in Arabidopsis during dark-induced senescence. *Plant Physiology* **157**, 55–69.
- Araújo WL, Nunes-Nesi A, Osorio S, *et al.* 2011b. Antisense inhibition of the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase enhances photosynthesis and growth in tomato via an organic acid-mediated effect on stomatal aperture. *The Plant Cell* **23**, 600–627.
- Araújo WL, Tohge T, Ishizaki K, Leaver CJ, Fernie AR. 2011c. Protein degradation—an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends in Plant Science* **16**, 489–498.
- Armas AM, Balparda M, Turowski VR, Busi MV, Pagani MA, Gomez-Casati DF. 2019. Altered levels of mitochondrial NFS1 affect cellular Fe and S contents in plants. *Plant Cell Reports* **38**, 981–990.
- Arnal N, Alban C, Quadrado M, Grandjean O, Mireau H. 2006. The Arabidopsis Bio2 protein requires mitochondrial targeting for activity. *Plant Molecular Biology* **62**, 471–479.
- Arnaud N, Ravet K, Borlotti A, Touraine B, Boucherez J, Fizames C, Briat JF, Cellier F, Gaymard F. 2007. The iron-responsive element (IRE)/iron-regulatory protein 1 (IRP1)-cytosolic aconitase iron-regulatory switch does not operate in plants. *The Biochemical Journal* **405**, 523–531.
- Arragain S, Handelman SK, Forouhar F, Wei FY, Tomizawa K, Hunt JF, Douki T, Fontecave M, Mulliez E, Atta M. 2010. Identification of eukaryotic and prokaryotic methylthioesterase for biosynthesis of 2-methylthio-*N*<sup>6</sup>-threonylcarbamoyladenine in tRNA. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 28425–28433.
- Atkinson A, Smith P, Fox JL, Cui TZ, Khalimonchuk O, Winge DR. 2011. The LYR protein Mzm1 functions in the insertion of the Rieske Fe/S protein in yeast mitochondria. *Molecular and Cellular Biology* **31**, 3988–3996.
- Azam T, Przybyla-Toscano J, Vignols F, Couturier J, Rouhier N, Johnson MK. 2020a. The Arabidopsis mitochondrial glutaredoxin GRXS15 provides [2Fe–2S] clusters for ISCA-mediated [4Fe–4S] cluster maturation. *International Journal of Molecular Science* **21**, 9237.
- Azam T, Przybyla-Toscano J, Vignols F, Couturier J, Rouhier N, Johnson MK. 2020b. [4Fe–4S] cluster trafficking mediated by Arabidopsis mitochondrial ISCA and NFU proteins. *Journal of Biological Chemistry* **295**, 18367–18378.
- Baldet P, Alban C, Douce R. 1997. Biotin synthesis in higher plants: purification and characterization of *bioB* gene product equivalent from *Arabidopsis thaliana* overexpressed in *Escherichia coli* and its subcellular localization in pea leaf cells. *FEBS Letters* **419**, 206–210.
- Baldet P, Ruffet ML. 1996. Biotin synthesis in higher plants: isolation of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana bioB*-gene product equivalent by functional complementation of a biotin auxotroph mutant *bioB105* of *Escherichia coli* K12. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Serie III, Sciences de la Vie* **319**, 99–106.
- Balk J, Pilon M. 2011. Ancient and essential: the assembly of iron–sulfur clusters in plants. *Trends in Plant Science* **16**, 218–226.
- Bandyopadhyay S, Gama F, Molina-Navarro MM, *et al.* 2008. Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe–2S] clusters. *The EMBO Journal* **27**, 1122–1133.
- Barthelme D, Scheele U, Dinkelaker S, *et al.* 2007. Structural organization of essential iron–sulfur clusters in the evolutionarily highly conserved ATP-binding cassette protein ABCE1. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 14598–14607.
- Beilschmidt LK, Ollagnier de Choudens S, Fournier M, *et al.* 2017. ISCA1 is essential for mitochondrial Fe4S4 biogenesis in vivo. *Nature Communications* **8**, 15124.
- Bernard DG, Cheng Y, Zhao Y, Balk J. 2009. An allelic mutant series of ATM3 reveals its key role in the biogenesis of cytosolic iron–sulfur proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology* **151**, 590–602.
- Bernard DG, Netz DJ, Lagny TJ, Pierik AJ, Balk J. 2013. Requirements of the cytosolic iron–sulfur cluster assembly pathway in Arabidopsis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **368**, 20120259.
- Berndt C, Christ L, Rouhier N, Mühlenhoff U. 2020. Glutaredoxins with iron–sulphur clusters in eukaryotes—structure, function and impact on disease. *Biochimica et Biophysica Acta* **1862**, 148317.
- Björk GR, Huang B, Persson OP, Byström AS. 2007. A conserved modified wobble nucleoside (mcm5s2U) in lysyl-tRNA is required for viability in yeast. *RNA* **13**, 1245–1255.
- Boal AK, Grove TL, McLaughlin MI, Yennawar NH, Booker SJ, Rosenzweig AC. 2011. Structural basis for methyl transfer by a radical SAM enzyme. *Science* **332**, 1089–1092.
- Boavida LC, Shuai B, Yu HJ, Pagnussat GC, Sundaresan V, McCormick S. 2009. A collection of Ds insertional mutants associated with defects in male gametophyte development and function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **181**, 1369–1385.
- Boniecki MT, Freibert SA, Mühlenhoff U, Lill R, Cygler M. 2017. Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex. *Nature Communications* **8**, 1287.
- Bouvier D, Labessan N, Clémancey M, Latour JM, Ravanat JL, Fontecave M, Atta M. 2014. TtcA a new tRNA-thioltransferase with an Fe–S cluster. *Nucleic Acids Research* **42**, 7960–7970.
- Brancaccio D, Gallo A, Mikolajczyk M, Zovo K, Palumaa P, Novellino E, Piccioli M, Ciofi-Baffoni S, Banci L. 2014. Formation of [4Fe–4S] clusters in the mitochondrial iron–sulfur cluster assembly machinery. *Journal of the American Chemical Society* **136**, 16240–16250.
- Broderick JB, Duffus BR, Duschene KS, Shepard EM. 2014. Radical S-adenosylmethionine enzymes. *Chemical Reviews* **114**, 4229–4317.
- Busi MV, Maliandi MV, Valdez H, Clemente M, Zabaleta EJ, Araya A, Gomez-Casati DF. 2006. Deficiency of *Arabidopsis thaliana* frataxin alters activity of mitochondrial Fe–S proteins and induces oxidative stress. *The Plant Journal* **48**, 873–882.
- Busi MV, Zabaleta EJ, Araya A, Gomez-Casati DF. 2004. Functional and molecular characterization of the frataxin homolog from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **576**, 141–144.
- Bych K, Kerscher S, Netz DJ, Pierik AJ, Zwicker K, Huynen MA, Lill R, Brandt U, Balk J. 2008. The iron–sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly. *The EMBO Journal* **27**, 1736–1746.
- Cai K, Tonelli M, Frederick RO, Markley JL. 2017. Human mitochondrial ferredoxin 1 (FDX1) and ferredoxin 2 (FDX2) both bind cysteine desulfurase

- and donate electrons for iron–sulfur cluster biosynthesis. *Biochemistry* **56**, 487–499.
- Calvo SE, Tucker EJ, Compton AG, et al.** 2010. High-throughput, pooled sequencing identifies mutations in NUBPL and FOXRED1 in human complex I deficiency. *Nature Genetics* **42**, 851–858.
- Cameron JM, Janer A, Levandovskiy V, Mackay N, Rouault TA, Tong WH, Ogilvie I, Shoubridge EA, Robinson BH.** 2011. Mutations in iron–sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes. *American Journal of Human Genetics* **89**, 486–495.
- Carrie C, Giraud E, Duncan O, et al.** 2010. Conserved and novel functions for *Arabidopsis thaliana* MIA40 in assembly of proteins in mitochondria and peroxisomes. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 36138–36148.
- Carrie C, Kühn K, Murcha MW, Duncan O, Small ID, O’Toole N, Whelan J.** 2009. Approaches to defining dual-targeted proteins in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **57**, 1128–1139.
- Chamizo-Ampudia A, Sanz-Luque E, Llamas A, Galvan A, Fernandez E.** 2017. Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis. *Trends in Plant Science* **22**, 163–174.
- Chamizo-Ampudia A, Sanz-Luque E, Llamas Á, Ocaña-Calahorra F, Mariscal V, Carreras A, Barroso JB, Galván A, Fernández E.** 2016. A dual system formed by the ARC and NR molybdoenzymes mediates nitrite-dependent NO production in *Chlamydomonas*. *Plant, Cell & Environment* **39**, 2097–2107.
- Chen M, Asai S, Narai S, et al.** 2017. Biochemical and structural characterization of oxygen-sensitive 2-thiouridine synthesis catalyzed by an iron–sulfur protein TtuA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*.
- Chrobok D, Law SR, Brouwer B, et al.** 2016. Dissecting the metabolic role of mitochondria during developmental leaf senescence. *Plant Physiology* **172**, 2132–2153.
- Cicchillo RM, Lee KH, Balesanu-Gogonea C, Nesbitt NM, Krebs C, Booker SJ.** 2004. *Escherichia coli* lipoyl synthase binds two distinct [4Fe–4S] clusters per polypeptide. *Biochemistry* **43**, 11770–11781.
- Cobessi D, Dumas R, Pautre V, Meinguet C, Ferrer JL, Alban C.** 2012. Biochemical and structural characterization of the *Arabidopsis* bifunctional enzyme dethiobiotin synthetase-diaminopelargonic acid aminotransferase: evidence for substrate channeling in biotin synthesis. *The Plant Cell* **24**, 1608–1625.
- Coomber SA, Jones RM, Jordan PM, Hunter CN.** 1992. A putative anaerobic coproporphyrinogen III oxidase in *Rhodobacter sphaeroides*. I. Molecular cloning, transposon mutagenesis and sequence analysis of the gene. *Molecular Microbiology* **6**, 3159–3169.
- Cory SA, Van Vranken JG, Brignole EJ, Patra S, Winge DR, Drennan CL, Rutter J, Barondeau DP.** 2017. Structure of human Fe–S assembly subcomplex reveals unexpected cysteine desulfurase architecture and acyl-ACP–ISD11 interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **114**, E5325–E5334.
- Coschigano KT, Melo-Oliveira R, Lim J, Coruzzi GM.** 1998. *Arabidopsis gls* mutants and distinct Fd-GOGAT genes. Implications for photorespiration and primary nitrogen assimilation. *The Plant Cell* **10**, 741–752.
- Couturier J, Touraine B, Briat JF, Gaymard F, Rouhier N.** 2013. The iron–sulfur cluster assembly machineries in plants: current knowledge and open questions. *Frontiers in Plant Science* **4**, 259.
- Couturier J, Wu HC, Dhalleine T, Pégeot H, Sudre D, Gualberto JM, Jacquot JP, Gaymard F, Vignols F, Rouhier N.** 2014. Monothiol glutaredoxin–BolA interactions: redox control of *Arabidopsis thaliana* BolA2 and SufE1. *Molecular Plant* **7**, 187–205.
- Cronan JE.** 2016. Assembly of lipoic acid on its cognate enzymes: an extraordinary and essential biosynthetic pathway. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **80**, 429–450.
- Cronan JE.** 2018. Advances in synthesis of biotin and assembly of lipoic acid. *Current Opinion in Chemical Biology* **47**, 60–66.
- Cui TZ, Smith PM, Fox JL, Khalimonchuk O, Winge DR.** 2012. Late-stage maturation of the Rieske Fe/S protein: Mzm1 stabilizes Rip1 but does not facilitate its translocation by the AAA ATPase Bcs1. *Molecular and Cellular Biology* **32**, 4400–4409.
- Delaunay S, Rapino F, Tharun L, et al.** 2016. Eip3 links tRNA modification to IRES-dependent translation of LEF1 to sustain metastasis in breast cancer. *Journal of Experimental Medicine* **213**, 2503–2523.
- Dibley MG, Formosa LE, Lyu B, Reljic B, McGann D, Muellner-Wong L, Kraus F, Sharpe AJ, Stroud DA, Ryan MT.** 2020. The mitochondrial acyl-carrier protein interaction network highlights important roles for LYRM family members in complex I and mitoribosome assembly. *Molecular & Cellular Proteomics* **19**, 65–77.
- Ding G, Che P, Ilarslan H, Wurtele ES, Nikolau BJ.** 2012. Genetic dissection of methylcrotonyl CoA carboxylase indicates a complex role for mitochondrial leucine catabolism during seed development and germination. *The Plant Journal* **70**, 562–577.
- Douce R, Bourguignon J, Neuburger M, Rébeillé F.** 2001. The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends in Plant Science* **6**, 167–176.
- Dunkley TP, Hester S, Shadforth IP, et al.** 2006. Mapping the *Arabidopsis* organelle proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **103**, 6518–6523.
- Dutkiewicz R, Marszałek J, Schilke B, Craig EA, Lill R, Mühlhoff U.** 2006. The Hsp70 chaperone Ssq1p is dispensable for iron–sulfur cluster formation on the scaffold protein Isu1p. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 7801–7808.
- Dutkiewicz R, Schilke B, Cheng S, Knieszner H, Craig EA, Marszałek J.** 2004. Sequence-specific interaction between mitochondrial Fe–S scaffold protein Isu and Hsp70 Ssq1 is essential for their in vivo function. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 29167–29174.
- Dutkiewicz R, Schilke B, Knieszner H, Walter W, Craig EA, Marszałek J.** 2003. Ssq1, a mitochondrial Hsp70 involved in iron–sulfur (Fe/S) center biogenesis. Similarities to and differences from its bacterial counterpart. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 29719–29727.
- Duval M, Job C, Alban C, Douce R, Job D.** 1994. Developmental patterns of free and protein-bound biotin during maturation and germination of seeds of *Pisum sativum*: characterization of a novel seed-specific biotinylated protein. *The Biochemical Journal* **299**, 141–150.
- Elorza A, León G, Gómez I, Mouras A, Holuigue L, Araya A, Jordana X.** 2004. Nuclear SDH2-1 and SDH2-2 genes, encoding the iron–sulfur subunit of mitochondrial complex II in *Arabidopsis*, have distinct cell-specific expression patterns and promoter activities. *Plant Physiology* **136**, 4072–4087.
- Engel N, van den Daele K, Kolukisaoglu U, Morgenthal K, Weckwerth W, Pärnik T, Keerberg O, Bauwe H.** 2007. Deletion of glycine decarboxylase in *Arabidopsis* is lethal under nonphotorespiratory conditions. *Plant Physiology* **144**, 1328–1335.
- Ewald R, Hoffmann C, Florian A, Neuhaus E, Fernie AR, Bauwe H.** 2014. Lipoate-protein ligase and octanoyltransferase are essential for protein lipoylation in mitochondria of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **165**, 978–990.
- Ewen KM, Ringle M, Bernhardt R.** 2012. Adrenodoxin—a versatile ferredoxin. *IUBMB Life* **64**, 506–512.
- Figueroa P, León G, Elorza A, Holuigue L, Jordana X.** 2001. Three different genes encode the iron–sulfur subunit of succinate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **46**, 241–250.
- Filser M, Comini MA, Molina-Navarro MM, Dirdjaja N, Herrero E, Krauth-Siegel RL.** 2008. Cloning, functional analysis, and mitochondrial localization of *Trypanosoma brucei* monothiol glutaredoxin-1. *Biological Chemistry* **389**, 21–32.
- Finkemeier I, Laxa M, Miguet L, Howden AJ, Sweetlove LJ.** 2011. Proteins of diverse function and subcellular location are lysine acetylated in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **155**, 1779–1790.
- Flint DH, Allen RM.** 1996. Iron–sulfur proteins with nonredox functions. *Chemical Reviews* **96**, 2315–2334.
- Forouhar F, Arragain S, Atta M, et al.** 2013. Two Fe–S clusters catalyze sulfur insertion by radical-SAM methylthiotransferases. *Nature Chemical Biology* **9**, 333–338.

- Fox NG, Yu X, Feng X, Bailey HJ, Martelli A, Nabhan JF, Strain-Damerell C, Bulawa C, Yue WW, Han S.** 2019. Structure of the human frataxin-bound iron–sulfur cluster assembly complex provides insight into its activation mechanism. *Nature Communications* **10**, 2210.
- Frazzon AP, Ramirez MV, Warek U, Balk J, Frazzon J, Dean DR, Winkel BS.** 2007. Functional analysis of Arabidopsis genes involved in mitochondrial iron–sulfur cluster assembly. *Plant Molecular Biology* **64**, 225–240.
- Fu X, Guan X, Garlock R, Nikolau BJ.** 2020. Mitochondrial fatty acid synthase utilizes multiple acyl carrier protein isoforms. *Plant Physiology* **183**, 547–557.
- Fuchs P, Rugen N, Carrie C, et al.** 2020. Single organelle function and organization as estimated from Arabidopsis mitochondrial proteomics. *The Plant Journal* **101**, 420–441.
- Gakh O, Ranatunga W, Smith DY 4<sup>th</sup>, Ahlgren EC, Al-Karadaghi S, Thompson JR, Isaya G.** 2016. Architecture of the human mitochondrial iron–sulfur cluster assembly machinery. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 21296–21321.
- Gardeström P, Igamberdiev AU.** 2016. The origin of cytosolic ATP in photosynthetic cells. *Physiologia Plantarum* **157**, 367–379.
- Gelling C, Dawes IW, Richhardt N, Lill R, Mühlhoff U.** 2008. Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 1851–1861.
- Gervason S, Larkem D, Mansour AB, et al.** 2019. Physiologically relevant reconstitution of iron–sulfur cluster biosynthesis uncovers persulfide-processing functions of ferredoxin-2 and frataxin. *Nature Communications* **10**, 3566.
- Gloaguen P, Bournais S, Alban C, et al.** 2017. ChloroKB: a web application for the integration of knowledge related to chloroplast metabolic network. *Plant Physiology* **174**, 922–934.
- Golinelli-Cohen MP, Lescop E, Mons C, Gonçalves S, Clémancey M, Santolini J, Guittet E, Blondin G, Latour JM, Bouton C.** 2016. Redox control of the human iron–sulfur repair protein MitoNEET activity via its iron–sulfur cluster. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 7583–7593.
- Gourdoupis S, Nasta V, Calderone V, Ciofi-Baffoni S, Banci L.** 2018. IBA57 recruits ISCA2 to form a [2Fe–2S] cluster-mediated complex. *Journal of the American Chemical Society* **140**, 14401–14412.
- Greenwood C, Selth LA, Dirac-Svejstrup AB, Svejstrup JQ.** 2009. An iron–sulfur cluster domain in Elp3 important for the structural integrity of elongator. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 141–149.
- Grell TAJ, Kincannon WM, Bruender NA, Blaesi EJ, Krebs C, Bandarian V, Drennan CL.** 2018. Structural and spectroscopic analyses of the sporulation killing factor biosynthetic enzyme SkfB, a bacterial AdoMet radical sactisynthase. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 17349–17361.
- Guan X, Diez T, Prasad TK, Nikolau BJ, Wurtele ES.** 1999. Geranyl-CoA carboxylase: a novel biotin-containing enzyme in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **362**, 12–21.
- Hansen BO, Meyer EH, Ferrari C, Vaid N, Movahedi S, Vandepoele K, Nikoloski Z, Mutwil M.** 2018. Ensemble gene function prediction database reveals genes important for complex I formation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **217**, 1521–1534.
- Hänzelmann P, Schindelin H.** 2004. Crystal structure of the S-adenosylmethionine-dependent enzyme MoaA and its implications for molybdenum cofactor deficiency in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **101**, 12870–12875.
- Harmer JE, Hiscox MJ, Dinis PC, Fox SJ, Iliopoulos A, Hussey JE, Sandy J, Van Beek FT, Essex JW, Roach PL.** 2014. Structures of lipoyl synthase reveal a compact active site for controlling sequential sulfur insertion reactions. *The Biochemical Journal* **464**, 123–133.
- Havemeyer A, Bittner F, Wollers S, Mendel R, Kunze T, Clement B.** 2006. Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 34796–34802.
- Heazlewood JL, Tonti-Filippini JS, Gout AM, Day DA, Whelan J, Millar AH.** 2004. Experimental analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *The Plant Cell* **16**, 241–256.
- Heis MD, Ditmer EM, de Oliveira LA, Frazzon AP, Margis R, Frazzon J.** 2011. Differential expression of cysteine desulfurases in soybean. *BMC Plant Biology* **11**, 166.
- Hernández HL, Pierrel F, Elleingand E, García-Serres R, Huynh BH, Johnson MK, Fontecave M, Atta M.** 2007. MiaB, a bifunctional radical-S-adenosylmethionine enzyme involved in the thiolation and methylation of tRNA, contains two essential [4Fe–4S] clusters. *Biochemistry* **46**, 5140–5147.
- Hey D, Ortega-Rodes P, Fan T, Schnurrer F, Brings L, Hedtke B, Grimm B.** 2016. Transgenic tobacco lines expressing sense or antisense FERROCHELATASE 1 RNA show modified ferredoxin activity in roots and provide experimental evidence for dual localization of ferredoxin 1. *Plant & Cell Physiology* **57**, 2576–2585.
- Hildebrandt TM, Nunes Nesi A, Araújo WL, Braun HP.** 2015. Amino acid catabolism in plants. *Molecular Plant* **8**, 1563–1579.
- Hirst J, Roessler MM.** 2016. Energy conversion, redox catalysis and generation of reactive oxygen species by respiratory complex I. *Biochimica et Biophysica Acta* **1857**, 872–883.
- Hooks MA, Allwood JW, Harrison JK, Kopka J, Erban A, Goodacre R, Balk J.** 2014. Selective induction and subcellular distribution of ACONITASE 3 reveal the importance of cytosolic citrate metabolism during lipid mobilization in Arabidopsis. *The Biochemical Journal* **463**, 309–317.
- Hooper CM, Castleden IR, Tanz SK, Aryamanesh N, Millar AH.** 2017. SUBA4: the interactive data analysis centre for Arabidopsis subcellular protein locations. *Nucleic Acids Research* **45**, D1064–D1074.
- Hu C, Lin SY, Chi WT, Charng YY.** 2012. Recent gene duplication and subfunctionalization produced a mitochondrial GrpE, the nucleotide exchange factor of the Hsp70 complex, specialized in thermotolerance to chronic heat stress in Arabidopsis. *Plant Physiology* **158**, 747–758.
- Huang S, Braun HP, Gawryluk RMR, Millar AH.** 2019. Mitochondrial complex II of plants: subunit composition, assembly, and function in respiration and signaling. *The Plant Journal* **98**, 405–417.
- Huang S, Li L, Petereit J, Millar AH.** 2020. Protein turnover rates in plant mitochondria. *Mitochondrion* **53**, 57–65.
- Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O’Shea EK.** 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686–691.
- Iñigo S, Durand AN, Ritter A, et al.** 2016. Glutaredoxin GRXS17 associates with the cytosolic iron–sulfur cluster assembly pathway. *Plant Physiology* **172**, 858–873.
- Ishizaki K, Larson TR, Schauer N, Fernie AR, Graham IA, Leaver CJ.** 2005. The critical role of Arabidopsis electron-transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase during dark-induced starvation. *The Plant Cell* **17**, 2587–2600.
- Ishizaki K, Schauer N, Larson TR, Graham IA, Fernie AR, Leaver CJ.** 2006. The mitochondrial electron transfer flavoprotein complex is essential for survival of Arabidopsis in extended darkness. *The Plant Journal* **47**, 751–760.
- Ivanova A, Gill-Hille M, Huang S, Branca RM, Kmiec B, Teixeira PF, Lehtö J, Whelan J, Murcha MW.** 2019. A mitochondrial LYR protein is required for complex I assembly. *Plant Physiology* **181**, 1632–1650.
- Jamai A, Salomé PA, Schilling SH, Weber AP, McClung CR.** 2009. Arabidopsis photorespiratory serine hydroxymethyltransferase activity requires the mitochondrial accumulation of ferredoxin-dependent glutamate synthase. *The Plant Cell* **21**, 595–606.
- Jin WB, Wu S, Xu YF, Yuan H, Tang GL.** 2020. Recent advances in HemN-like radical S-adenosyl-L-methionine enzyme-catalyzed reactions. *Natural Product Reports* **37**, 17–28.

- Job C, Laugel S, Duval M, Gallardo K, Job D.** 2001. Biochemical characterization of atypical biotinylation domains in seed proteins. *Seed Science Research* **11**, 149–162.
- John F, Philipp M, Leiber RM, Errafi S, Ringli C.** 2014. Ubiquitin-related modifiers of *Arabidopsis thaliana* influence root development. *PLoS One* **9**, e86862.
- Karcher A, Schele A, Hopfner KP.** 2008. X-ray structure of the complete ABC enzyme ABCE1 from *Pyrococcus abyssi*. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 7962–7971.
- Keech O, Gardeström P, Kleczkowski LA, Rouhier N.** 2017. The redox control of photorespiration: from biochemical and physiological aspects to biotechnological considerations. *Plant, Cell & Environment* **40**, 553–569.
- Keech O, Pesquet E, Ahad A, Askne A, Nordvall D, Vodnala SM, Tuominen H, Hurry V, Dizengremel P, Gardeström P.** 2007. The different fates of mitochondria and chloroplasts during dark-induced senescence in *Arabidopsis* leaves. *Plant, Cell & Environment* **30**, 1523–1534.
- Knowles JR.** 1989. The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annual Review of Biochemistry* **58**, 195–221.
- Kruse T, Gehl C, Geisler M, Lehrke M, Ringel P, Hallier S, Hänsch R, Mendel RR.** 2010. Identification and biochemical characterization of molybdenum cofactor-binding proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 6623–6635.
- Kruse I, Maclean AE, Hill L, Balk J.** 2018. Genetic dissection of cyclic pyranopterin monophosphate biosynthesis in plant mitochondria. *The Biochemical Journal* **475**, 495–509.
- Kühn K, Obata T, Feher K, Bock R, Fernie AR, Meyer EH.** 2015. Complete mitochondrial complex I deficiency induces an up-regulation of respiratory fluxes that is abolished by traces of functional complex I. *Plant Physiology* **168**, 1537–1549.
- Kushnir S, Babiyshuk E, Storozhenko S, et al.** 2001. A mutation of the mitochondrial ABC transporter Sta1 leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant *starik*. *The Plant Cell* **13**, 89–100.
- Laloi C, Rayapuram N, Chartier Y, Grienenberger JM, Bonnard G, Meyer Y.** 2001. Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**, 14144–14149.
- Landry AP, Ding H.** 2014. The N-terminal domain of human DNA helicase Rtel1 contains a redox active iron-sulfur cluster. *BioMed Research International* **2014**, 285791.
- Lange H, Kaut A, Kispal G, Lill R.** 2000. A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**, 1050–1055.
- Lanz ND, Booker SJ.** 2015. Auxiliary iron-sulfur cofactors in radical SAM enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1853**, 1316–1334.
- Layer G, Moser J, Heinz DW, Jahn D, Schubert WD.** 2003. Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of radical SAM enzymes. *The EMBO Journal* **22**, 6214–6224.
- Leadon L, Busi MV, Gomez-Casati DF.** 2014. The mitochondrial proteins AtHscB and AtIsc1 involved in Fe-S cluster assembly interact with the Hsp70-type chaperon AtHscA2 and modulate its catalytic activity. *Mitochondrion* **19**, 375–381.
- Leadon L, Pagani MA, Balparda M, Busi MV, Gomez-Casati DF.** 2016. Altered levels of AtHSCB disrupts iron translocation from roots to shoots. *Plant Molecular Biology* **92**, 613–628.
- Lebigot E, Gagnard P, Dorboz I, et al.** 2017. Impact of mutations within the [Fe-S] cluster or the lipoic acid biosynthesis pathways on mitochondrial protein expression profiles in fibroblasts from patients. *Molecular Genetics and Metabolism* **122**, 85–94.
- Lee CP, Eubel H, O'Toole N, Millar AH.** 2011. Combining proteomics of root and shoot mitochondria and transcript analysis to define constitutive and variable components in plant mitochondria. *Phytochemistry* **72**, 1092–1108.
- Lee TT, Agarwalla S, Stroud RM.** 2004. Crystal structure of Ruma, an iron-sulfur cluster containing *E. coli* ribosomal RNA 5-methyluridine methyltransferase. *Structure* **12**, 397–407.
- Lefebvre-Legendre L, Vaillier J, Benabdelhak H, Velours J, Slonimski PP, di Rago JP.** 2001. Identification of a nuclear gene (FMC1) required for the assembly/stability of yeast mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase in heat stress conditions. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 6789–6796.
- Leiber RM, John F, Verherbruggen Y, Diet A, Knox JP, Ringli C.** 2010. The TOR pathway modulates the structure of cell walls in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **22**, 1898–1908.
- Léon S, Touraine B, Briat JF, Lobréaux S.** 2005. Mitochondrial localization of *Arabidopsis thaliana* Isu Fe-S scaffold proteins. *FEBS Letters* **579**, 1930–1934.
- Léon S, Touraine B, Ribot C, Briat JF, Lobréaux S.** 2003. Iron-sulphur cluster assembly in plants: distinct NFU proteins in mitochondria and plastids from *Arabidopsis thaliana*. *The Biochemical Journal* **371**, 823–830.
- Li L, Lavell A, Meng X, et al.** 2019. *Arabidopsis* DGD1 SUPPRESSOR1 is a subunit of the mitochondrial contact site and cristae organizing system and affects mitochondrial biogenesis. *The Plant Cell* **31**, 1856–1878.
- Li L, Nelson CJ, Trösch J, Castleden I, Huang S, Millar AH.** 2017. Protein degradation rate in *Arabidopsis thaliana* leaf growth and development. *The Plant Cell* **29**, 207–228.
- Li X, Ilarslan H, Brachova L, Qian HR, Li L, Che P, Wurtele ES, Nikolau BJ.** 2011. Reverse-genetic analysis of the two biotin-containing subunit genes of the heteromeric acetyl-coenzyme A carboxylase in *Arabidopsis* indicates a unidirectional functional redundancy. *Plant Physiology* **155**, 293–314.
- Liang X, Qin L, Liu P, Wang M, Ye H.** 2014. Genes for iron-sulphur cluster assembly are targets of abiotic stress in rice, *Oryza sativa*. *Plant, Cell & Environment* **37**, 780–794.
- Lill R.** 2020. From the discovery to molecular understanding of cellular iron-sulfur protein biogenesis. *Biological Chemistry* **401**, 855–876.
- Lill R, Freibert SA.** 2020. Mechanisms of mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis. *Annual Review of Biochemistry* **89**, 471–499.
- Logan DC.** 2006. Plant mitochondrial dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**, 430–441.
- López-Calcagno PE, Fisk S, Brown KL, Bull SE, South PF, Raines CA.** 2019. Overexpressing the H-protein of the glycine cleavage system increases biomass yield in glasshouse and field-grown transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnology Journal* **17**, 141–151.
- Mackenzie S, McIntosh L.** 1999. Higher plant mitochondria. *The Plant Cell* **11**, 571–586.
- Maclean AE, Hertle AP, Ligas J, Bock R, Balk J, Meyer EH.** 2018. Absence of complex I is associated with diminished respiratory chain function in European mistletoe. *Current Biology* **28**, 1614–1619.e3.
- Maio N, Ghezzi D, Verrigni D, Rizza T, Bertini E, Martinelli D, Zeviani M, Singh A, Carozzo R, Rouault TA.** 2016. Disease-causing SDHAF1 mutations impair transfer of Fe-S clusters to SDHB. *Cell Metabolism* **23**, 292–302.
- Maio N, Kim KS, Singh A, Rouault TA.** 2017. A single adaptable cochaperone-scaffold complex delivers nascent iron-sulfur clusters to mammalian respiratory chain complexes I–III. *Cell Metabolism* **25**, 945–953.e6.
- Maio N, Singh A, Uhrigshardt H, Saxena N, Tong WH, Rouault TA.** 2014. Cochaperone binding to LYR motifs confers specificity of iron sulfur cluster delivery. *Cell Metabolism* **19**, 445–457.
- Majewska J, Ciesielski SJ, Schilke B, Kominek J, Blenska A, Delewski W, Song JY, Marszalek J, Craig EA, Dutkiewicz R.** 2013. Binding of the chaperone Jac1 protein and cysteine desulfurase Nfs1 to the iron-sulfur cluster scaffold Isu protein is mutually exclusive. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 29134–29142.
- Maldonado M, Padavanni A, Zhou L, Guo F, Letts JA.** 2020. Atomic structure of a mitochondrial complex I intermediate from vascular plants. *eLife* **9**, e56664.
- Manicki M, Majewska J, Ciesielski S, Schilke B, Blenska A, Kominek J, Marszalek J, Craig EA, Dutkiewicz R.** 2014. Overlapping binding sites of the frataxin homologue assembly factor and the heat shock

protein 70 transfer factor on the Isu iron–sulfur cluster scaffold protein. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 30268–30278.

**Melber A, Na U, Vashisht A, Weiler BD, Lill R, Wohlschlegel JA, Winge DR.** 2016. Role of Nfu1 and Bol3 in iron–sulfur cluster transfer to mitochondrial clients. *eLife* **5**, e15991.

**Mendel RR.** 2013. The molybdenum cofactor. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 13165–13172.

**Mendel RR, Leimkühler S.** 2015. The biosynthesis of the molybdenum cofactors. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **20**, 337–347.

**Meyer EH, Heazlewood JL, Millar AH.** 2007. Mitochondrial acyl carrier proteins in *Arabidopsis thaliana* are predominantly soluble matrix proteins and none can be confirmed as subunits of respiratory Complex I. *Plant Molecular Biology* **64**, 319–327.

**Meyer EH, Welchen E, Carrie C.** 2019. Assembly of the complexes of the oxidative phosphorylation system in land plant mitochondria. *Annual Review of Plant Biology* **70**, 23–50.

**Moeder W, Del Pozo O, Navarre DA, Martin GB, Klessig DF.** 2007. Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Molecular Biology* **63**, 273–287.

**Moseler A, Aller I, Wagner S, et al.** 2015. The mitochondrial monothiol glutaredoxin S15 is essential for iron–sulfur protein maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **112**, 13735–13740.

**Mühlenhoff U, Richter N, Pines O, Pierik AJ, Lill R.** 2011. Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe–4S] proteins. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 41205–41216.

**Müller JJ, Lapko A, Bourenkov G, Ruckpaul K, Heinemann U.** 2001. Adrenodoxin reductase–adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 2786–2789.

**Muñoz-Nortes T, Pérez-Pérez JM, Sarmiento-Mañús R, Candela H, Micol JL.** 2017. Deficient glutamate biosynthesis triggers a concerted upregulation of ribosomal protein genes in *Arabidopsis*. *Scientific Reports* **7**, 6164.

**Muralla R, Chen E, Sweeney C, Gray JA, Dickerman A, Nikolau BJ, Meinke D.** 2008. A bifunctional locus (BIO3–BIO1) required for biotin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **146**, 60–73.

**Murari A, Thiriveedi VR, Mohammad F, Vengaldas V, Gorla M, Tammineni P, Krishnamoorthy T, Sepuri NB.** 2015. Human mitochondrial MIA40 (CHCHD4) is a component of the Fe–S cluster export machinery. *The Biochemical Journal* **471**, 231–241.

**Na U, Yu W, Cox J, Bricker DK, Brockmann K, Rutter J, Thummel CS, Winge DR.** 2014. The LYR factors SDHAF1 and SDHAF3 mediate maturation of the iron–sulfur subunit of succinate dehydrogenase. *Cell Metabolism* **20**, 253–266.

**Narsai R, Howell KA, Millar AH, O’Toole N, Small I, Whelan J.** 2007. Genome-wide analysis of mRNA decay rates and their determinants in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **19**, 3418–3436.

**Nasta V, Giachetti A, Ciofi-Baffoni S, Banci L.** 2017. Structural insights into the molecular function of human [2Fe–2S] BOLA1–GRX5 and [2Fe–2S] BOLA3–GRX5 complexes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1861**, 2119–2131.

**Nasta V, Suraci D, Gourdupis S, Ciofi-Baffoni S, Banci L.** 2020. A pathway for assembling [4Fe–4S]<sup>2+</sup> clusters in mitochondrial iron–sulfur protein biogenesis. *The FEBS Journal* **287**, 2312–2327.

**Navarro-Sastre A, Tort F, Stehling O, et al.** 2011. A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe–S proteins. *American Journal of Human Genetics* **89**, 656–667.

**Nechushtai R, Conlan AR, Harir Y, et al.** 2012. Characterization of *Arabidopsis* NEET reveals an ancient role for NEET proteins in iron metabolism. *The Plant Cell* **24**, 2139–2154.

**Niehaus M, Straube H, Künzler P, Rugen N, Hegermann J, Gialvalisco P, Eubel H, Witte CP, Herde M.** 2020. Rapid affinity purification of tagged plant mitochondria (Mito-AP) for metabolome and proteome analyses. *Plant Physiology* **182**, 1194–1210.

**Noma A, Kirino Y, Ikeuchi Y, Suzuki T.** 2006. Biosynthesis of wybutosine, a hyper-modified nucleoside in eukaryotic phenylalanine tRNA. *The EMBO Journal* **25**, 2142–2154.

**Noma A, Sakaguchi Y, Suzuki T.** 2009. Mechanistic characterization of the sulfur-relay system for eukaryotic 2-thiouridine biogenesis at tRNA wobble positions. *Nucleic Acids Research* **37**, 1335–1352.

**Ohbayashi I, Huang S, Fukaki H, Song X, Sun S, Morita MT, Tasaka M, Millar AH, Furutani M.** 2019. Mitochondrial pyruvate dehydrogenase contributes to auxin-regulated organ development. *Plant Physiology* **180**, 896–909.

**Omura T, Gotoh O.** 2017. Evolutionary origin of mitochondrial cytochrome P450. *Journal of Biochemistry* **161**, 399–407.

**Ott G, Havemeyer A, Clement B.** 2015. The mammalian molybdenum enzymes of mARC. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **20**, 265–275.

**Pagnussat GC, Yu HJ, Ngo QA, Rajani S, Mayalagu S, Johnson CS, Capron A, Xie LF, Ye D, Sundaresan V.** 2005. Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. *Development* **132**, 603–614.

**Parent A, Elduque X, Cornu D, Belot L, Le Caer JP, Grandas A, Toledano MB, D’Autréaux B.** 2015. Mammalian frataxin directly enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to both ISCU and free thiols. *Nature Communications* **6**, 5686.

**Patton DA, Schetter AL, Franzmann LH, Nelson K, Ward ER, Meinke DW.** 1998. An embryo-defective mutant of *Arabidopsis* disrupted in the final step of biotin synthesis. *Plant Physiology* **116**, 935–946.

**Patton DA, Volrath S, Ward ER.** 1996. Complementation of an *Arabidopsis thaliana* biotin auxotroph with an *Escherichia coli* biotin biosynthetic gene. *Molecular & General Genetics* **251**, 261–266.

**Paul VD, Lill R.** 2015. Biogenesis of cytosolic and nuclear iron–sulfur proteins and their role in genome stability. *Biochimica et Biophysica Acta* **1853**, 1528–1539.

**Peleh V, Zannini F, Backes S, Rouhier N, Herrmann JM.** 2017. Erv1 of *Arabidopsis thaliana* can directly oxidize mitochondrial intermembrane space proteins in the absence of redox-active Mia40. *BMC Biology* **15**, 106.

**Peng C, Uygun S, Shiu SH, Last RL.** 2015. The impact of the branched-chain ketoacid dehydrogenase complex on amino acid homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **169**, 1807–1820.

**Perche-Letuvé P, Kathirvelu V, Berggren G, et al.** 2012. 4-Demethylwyosine synthase from *Pyrococcus abyssi* is a radical-S-adenosyl-L-methionine enzyme with an additional [4Fe–4S]<sup>2+</sup> cluster that interacts with the pyruvate co-substrate. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 41174–41185.

**Peters K, Niessen M, Peterhänsel C, Späth B, Hölzle A, Binder S, Marchfelder A, Braun HP.** 2012. Complex I-complex II ratio strongly differs in various organs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **79**, 273–284.

**Pétriacoq P, de Bont L, Genestout L, et al.** 2017. Photoperiod affects the phenotype of mitochondrial complex I mutants. *Plant Physiology* **173**, 434–455.

**Piccicocchi A, Douce R, Alban C.** 2003. The plant biotin synthase reaction. Identification and characterization of essential mitochondrial accessory protein components. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 24966–24975.

**Pierrel F, Björk GR, Fontecave M, Atta M.** 2002. Enzymatic modification of tRNAs: MiaB is an iron–sulfur protein. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 13367–13370.

**Pierrel F, Hamelin O, Douki T, Kieffer-Jaquinod S, Mühlenhoff U, Ozeir M, Lill R, Fontecave M.** 2010. Involvement of mitochondrial ferredoxin and para-aminobenzoic acid in yeast coenzyme Q biosynthesis. *Chemistry & Biology* **17**, 449–459.

- Pinon V, Ravanel S, Douce R, Alban C.** 2005. Biotin synthesis in plants. The first committed step of the pathway is catalyzed by a cytosolic 7-keto-8-aminopelargonic acid synthase. *Plant Physiology* **139**, 1666–1676.
- Potel F, Valadier MH, Ferrario-Méry S, et al.** 2009. Assimilation of excess ammonium into amino acids and nitrogen translocation in *Arabidopsis thaliana*—roles of glutamate synthases and carbamoylphosphate synthetase in leaves. *The FEBS Journal* **276**, 4061–4076.
- Pratibha P, Singh SK, Srinivasan R, Bhat SR, Sreenivasulu Y.** 2017. Gametophyte development needs mitochondrial coproporphyrinogen III oxidase function. *Plant Physiology* **174**, 258–275.
- Przybyla-Toscano J, Boussardon C, Law S, Rouhier N, Keech O.** 2021. Gene atlas of iron-containing proteins in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* (in press), doi:10.1111/tj.15154.
- Przybyla-Toscano J, Roland M, Gaymard F, Couturier J, Rouhier N.** 2018. Roles and maturation of iron-sulfur proteins in plastids. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **23**, 545–566.
- Przybyla-Toscano J, Roret T, Couturier J, Rouhier N.** 2017. FeS cluster assembly: role of monothiol Grxs and Nfu proteins. *Encyclopedia of inorganic and bioinorganic chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Puyaubert J, Denis L, Alban C.** 2008. Dual targeting of *Arabidopsis* holocarboxylase synthetase1: a small upstream open reading frame regulates translation initiation and protein targeting. *Plant Physiology* **146**, 478–491.
- Rajagopalan KV, Johnson JL.** 1992. The pterin molybdenum cofactors. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 10199–10202.
- Rébeillé F, Alban C, Bourguignon J, Ravanel S, Douce R.** 2007. The role of plant mitochondria in the biosynthesis of coenzymes. *Photosynthesis Research* **92**, 149–162.
- Reiter V, Matschkal DM, Wagner M, Globisch D, Kneutinger AC, Müller M, Carell T.** 2012. The CDK5 repressor CDK5RAP1 is a methylthiotransferase acting on nuclear and mitochondrial RNA. *Nucleic Acids Research* **40**, 6235–6240.
- Restovic F, Espinoza-Corral R, Gómez I, Vicente-Carbajosa J, Jordana X.** 2017. An active mitochondrial complex II present in mature seeds contains an embryo-specific iron-sulfur subunit regulated by ABA and bZIP53 and is involved in germination and seedling establishment. *Frontiers in Plant Science* **8**, 277.
- Romero LC, Aroca MÁ, Laureano-Marín AM, Moreno I, García I, Gotor C.** 2014. Cysteine and cysteine-related signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* **7**, 264–276.
- Roret T, Pégeot H, Couturier J, Mulliert G, Rouhier N, Didierjean C.** 2014. X-ray structures of Nfs2, the plastidial cysteine desulfurase from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications* **70**, 1180–1185.
- Roschztardt H, Fuentes I, Vásquez M, Corvalán C, León G, Gómez I, Araya A, Holuigue L, Vicente-Carbajosa J, Jordana X.** 2009. A nuclear gene encoding the iron-sulfur subunit of mitochondrial complex II is regulated by B3 domain transcription factors during seed development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **150**, 84–95.
- Sample PJ, Kořený L, Paris Z, et al.** 2015. A common tRNA modification at an unusual location: the discovery of wyosine biosynthesis in mitochondria. *Nucleic Acids Research* **43**, 4262–4273.
- Sánchez LA, Gómez-Gallardo M, Díaz-Pérez AL, Cortés-Rojo C, Campos-García J.** 2019. Iba57p participates in maturation of a [2Fe–2S]-cluster Rieske protein and in formation of supercomplexes III/IV of *Saccharomyces cerevisiae* electron transport chain. *Mitochondrion* **44**, 75–84.
- Schäfer K, Künzler P, Schneider K, Klingl A, Eubel H, Carrie C.** 2020. The plant mitochondrial TAT pathway is essential for complex III biogenesis. *Current Biology* **30**, 840–853.
- Schertl P, Braun HP.** 2014. Respiratory electron transfer pathways in plant mitochondria. *Frontiers in Plant Science* **5**, 163.
- Schikowsky C, Senkler J, Braun HP.** 2017. SDH6 and SDH7 contribute to anchoring succinate dehydrogenase to the inner mitochondrial membrane in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **173**, 1094–1108.
- Schimmeyer J, Bock R, Meyer EH.** 2016. L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase is an assembly factor of the membrane arm of mitochondrial complex I in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **90**, 117–126.
- Schmucker S, Martelli A, Colin F, Page A, Wattenhofer-Donzé M, Reutenauer L, Puccio H.** 2011. Mammalian frataxin: an essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex. *PLoS One* **6**, e16199.
- Schwarz G, Mendel RR.** 2006. Molybdenum cofactor biosynthesis and molybdenum enzymes. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 623–647.
- Senkler J, Rugen N, Eubel H, Hegermann J, Braun HP.** 2018. Absence of complex I implicates rearrangement of the respiratory chain in European mistletoe. *Current Biology* **28**, 1606–1613.
- Senkler J, Senkler M, Eubel H, Hildebrandt T, Lengwenus C, Schertl P, Schwarzländer M, Wagner S, Wittig I, Braun HP.** 2017. The mitochondrial complexome of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **89**, 1079–1092.
- Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, Elsässer HP, Mühlhoff U, Webert H, Hobler A, Hannemann F, Bernhardt R, Lill R.** 2010. Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **107**, 11775–11780.
- Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, Netz DJ, Kerscher S, Elsässer HP, Wittig I, Balk J, Brandt U, Lill R.** 2009. Human ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I. *Molecular and Cellular Biology* **29**, 6059–6073.
- Sheftel AD, Wilbrecht C, Stehling O, Niggemeyer B, Elsässer HP, Mühlhoff U, Lill R.** 2012. The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe–4S] protein maturation. *Molecular Biology of the Cell* **23**, 1157–1166.
- Shi Y, Ghosh M, Kovtunovych G, Crooks DR, Rouault TA.** 2012. Both human ferredoxins 1 and 2 and ferredoxin reductase are important for iron-sulfur cluster biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1823**, 484–492.
- Somerville CR, Ogren WL.** 1980. Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking leaf glutamate synthase activity. *Nature* **286**, 257–259.
- Song L, Liu D.** 2015. Mutations in the three *Arabidopsis* genes that encode the E2 subunit of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex differentially affect enzymatic activity and plant growth. *Plant Cell Reports* **34**, 1919–1926.
- Song Z, Yang Y, Xu J, Ma R, Yu M.** 2014. Physiological and transcriptional responses in the iron-sulphur cluster assembly pathway under abiotic stress in peach (*Prunus persica* L.) seedlings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **117**, 419–430.
- Spiller MP, Ang SK, Ceh-Pavia E, Fisher K, Wang Q, Rigby SE, Lu H.** 2013. Identification and characterization of mitochondrial Mia40 as an iron-sulfur protein. *The Biochemical Journal* **455**, 27–35.
- Stegmaier K, Blinn CM, Bechtel DF, et al.** 2019. Atp1 and Aim32 are prototypes of bishistidinyl-coordinated non-rieske [2Fe–2S] proteins. *Journal of the American Chemical Society* **141**, 5753–5765.
- Ströher E, Grassl J, Carrie C, Fenske R, Whelan J, Millar AH.** 2016. Glutaredoxin S15 is involved in Fe–S cluster transfer in mitochondria influencing lipoic acid-dependent enzymes, plant growth, and arsenic tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **170**, 1284–1299.
- Su LW, Chang SH, Li MY, Huang HY, Jane WN, Yang JY.** 2013. Purification and biochemical characterization of *Arabidopsis* At-NEET, an ancient iron-sulfur protein, reveals a conserved cleavage motif for subcellular localization. *Plant Science* **213**, 46–54.
- Suzuki A, Rothstein S.** 1997. Structure and regulation of ferredoxin-dependent glutamate synthase from *Arabidopsis thaliana*. Cloning of cDNA expression in different tissues of wild-type and *gltS* mutant strains, and light induction. *European Journal of Biochemistry* **243**, 708–718.
- Takubo K, Morikawa T, Nonaka Y, Mizutani M, Takenaka S, Takabe K, Takahashi MA, Ohta D.** 2003. Identification and molecular characterization

of mitochondrial ferredoxins and ferredoxin reductase from *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **52**, 817–830.

**Tanabe Y, Maruyama J, Yamaoka S, Yahagi D, Matsuo I, Tsutsumi N, Kitamoto K.** 2011. Peroxisomes are involved in biotin biosynthesis in *Aspergillus* and *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 30455–30461.

**Tanaka R, Tanaka A.** 2007. Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 321–346.

**Tang HM, Pan K, Kong KY, Hu L, Chan LC, Siu KL, Sun H, Wong CM, Jin DY.** 2015. Loss of APD1 in yeast confers hydroxyurea sensitivity suppressed by Yap1p transcription factor. *Scientific Reports* **5**, 7897.

**Taylor NL, Heazlewood JL, Day DA, Millar AH.** 2004. Lipoic acid-dependent oxidative catabolism of alpha-keto acids in mitochondria provides evidence for branched-chain amino acid catabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **134**, 838–848.

**Teschner J, Lachmann N, Schulze J, Geisler M, Selbach K, Santamaria-Araujo J, Balk J, Mendel RR, Bittner F.** 2010. A novel role for *Arabidopsis* mitochondrial ABC transporter ATM3 in molybdenum cofactor biosynthesis. *The Plant Cell* **22**, 468–480.

**Timm S, Florian A, Arrivault S, Stitt M, Fernie AR, Bauwe H.** 2012. Glycine decarboxylase controls photosynthesis and plant growth. *FEBS Letters* **586**, 3692–3697.

**Tone Y, Kawai-Yamada M, Uchimiya H.** 2004. Isolation and characterization of *Arabidopsis thaliana* *ISU1* gene. *Biochimica et Biophysica Acta* **1680**, 171–175.

**Turowski VR, Busi MV, Gomez-Casati DF.** 2012. Structural and functional studies of the mitochondrial cysteine desulfurase from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* **5**, 1001–1010.

**Uzarska MA, Dutkiewicz R, Freibert SA, Lill R, Mühlhoff U.** 2013. The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. *Molecular Biology of the Cell* **24**, 1830–1841.

**Uzarska MA, Nasta V, Weiler BD, Spantgar F, Ciofi-Baffoni S, Saviello MR, Gonnelli L, Mühlhoff U, Banci L, Lill R.** 2016. Mitochondrial Bol1 and Bol3 function as assembly factors for specific iron-sulfur proteins. *eLife* **5**, e16673.

**Uzarska MA, Przybyla-Toscano J, Spantgar F, Zannini F, Lill R, Mühlhoff U, Rouhier N.** 2018. Conserved functions of *Arabidopsis* mitochondrial late-acting maturation factors in the trafficking of iron-sulfur clusters. *Biochimica et Biophysica Acta* **1865**, 1250–1259.

**Van Aken O, Zhang B, Carrie C, Uggalla V, Paynter E, Giraud E, Whelan J.** 2009. Defining the mitochondrial stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* **2**, 1310–1324.

**Van Vranken JG, Jeong MY, Wei P, Chen YC, Gygi SP, Winge DR, Rutter J.** 2016. The mitochondrial acyl carrier protein (ACP) coordinates mitochondrial fatty acid synthesis with iron sulfur cluster biogenesis. *eLife* **5**, e17828.

**Vazzola V, Losa A, Soave C, Murgia I.** 2007. Knockout of frataxin gene causes embryo lethality in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* **581**, 667–672.

**Vigani G, Solti İDM, Thomine SB, Philippar K.** 2019. Essential and detrimental—an update on intracellular iron trafficking and homeostasis. *Plant & Cell Physiology* **60**, 1420–1439.

**Waas WF, de Crécy-Lagard V, Schimmel P.** 2005. Discovery of a gene family critical to wyosine base formation in a subset of phenylalanine-specific transfer RNAs. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 37616–37622.

**Waller JC, Alvarez S, Naponelli V, et al.** 2010. A role for tetrahydrofolates in the metabolism of iron-sulfur clusters in all domains of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **107**, 10412–10417.

**Waller JC, Ellens KW, Alvarez S, Loizeau K, Ravanel S, Hanson AD.** 2012. Mitochondrial and plastidial COG0354 proteins have folate-dependent functions in iron-sulphur cluster metabolism. *Journal of Experimental Botany* **63**, 403–411.

**Wang S, Bai G, Wang S, Yang L, Yang F, Wang Y, Zhu JK, Hua J.** 2016. Chloroplast RNA-binding protein RBD1 promotes chilling tolerance through 23S rRNA processing in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* **12**, e1006027.

**Wang YM, Yang Q, Liu YJ, Yang HL.** 2016. Molecular evolution and expression divergence of the aconitase (ACO) gene family in land plants. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1879.

**Warren JM, Sloan DB.** 2020. Interchangeable parts: the evolutionarily dynamic tRNA population in plant mitochondria. *Mitochondrion* **52**, 144–156.

**Watanabe N, Che FS, Iwano M, Takayama S, Yoshida S, Isogai A.** 2001. Dual targeting of spinach protoporphyrinogen oxidase II to mitochondria and chloroplasts by alternative use of two in-frame initiation codons. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 20474–20481.

**Webert H, Freibert SA, Gallo A, Heidenreich T, Linne U, Amlacher S, Hurt E, Mühlhoff U, Banci L, Lill R.** 2014. Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. *Nature Communications* **5**, 5013.

**Wei SS, Niu WT, Zhai XT, et al.** 2019. *Arabidopsis* mthHSC70-1 plays important roles in the establishment of COX-dependent respiration and redox homeostasis. *Journal of Experimental Botany* **70**, 5575–5590.

**Wei FY, Zhou B, Suzuki T, et al.** 2015. Cdk5rap1-mediated 2-methylthio modification of mitochondrial tRNAs governs protein translation and contributes to myopathy in mice and humans. *Cell Metabolism* **21**, 428–442.

**Weiler BD, Brück MC, Kothe I, Bill E, Lill R, Mühlhoff U.** 2020. Mitochondrial [4Fe–4S] protein assembly involves reductive [2Fe–2S] cluster fusion on ISCA1–ISCA2 by electron flow from ferredoxin FDX2. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **117**, 20555–20565.

**Wydro MM, Sharma P, Foster JM, Bych K, Meyer EH, Balk J.** 2013. The evolutionarily conserved iron-sulfur protein INDH is required for complex I assembly and mitochondrial translation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **25**, 4014–4027.

**Xu XM, Lin H, Latijnhouwers M, Møller SG.** 2009. Dual localized AtHscB involved in iron sulfur protein biogenesis in *Arabidopsis*. *PLoS One* **4**, e7662.

**Xu XM, Møller SG.** 2006. AtSuE is an essential activator of plastidic and mitochondrial desulfurases in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* **25**, 900–909.

**Yabe T, Nakai M.** 2006. *Arabidopsis* AtIsca-I is affected by deficiency of Fe–S cluster biosynthetic scaffold AtCnfU-V. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **340**, 1047–1052.

**Yasuno R, Wada H.** 1998. Biosynthesis of lipoic acid in *Arabidopsis*: cloning and characterization of the cDNA for lipoic acid synthase. *Plant Physiology* **118**, 935–943.

**Yasuno R, Wada H.** 2002. The biosynthetic pathway for lipoic acid is present in plastids and mitochondria in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **517**, 110–114.

**Ye H, Abdel-Ghany SE, Anderson TD, Pilon-Smits EA, Pilon M.** 2006. CpSufE activates the cysteine desulfurase CpNifS for chloroplastic Fe–S cluster formation. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 8958–8969.

**Yoshida K, Hisabori T.** 2016. Adenine nucleotide-dependent and redox-independent control of mitochondrial malate dehydrogenase activity in *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1857**, 810–818.

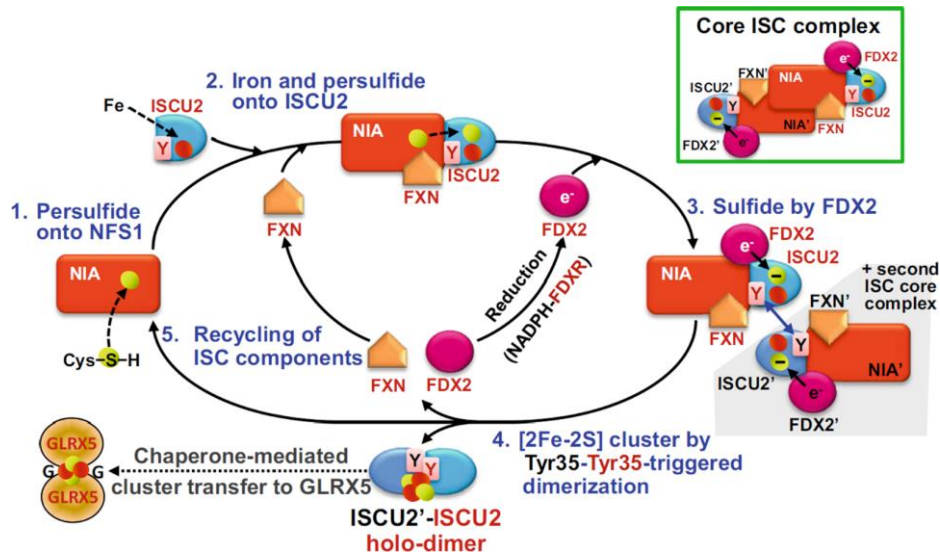
**Zannini F, Roret T, Przybyla-Toscano J, Dhalleine T, Rouhier N, Couturier J.** 2018. Mitochondrial *Arabidopsis thaliana* TRXo isoforms bind an iron-sulfur cluster and reduce NFU proteins in vitro. *Antioxidants* **7**, 142.

**Zhang B, Arcinas AJ, Radle MI, Silakov A, Booker SJ, Krebs C.** 2020. First step in catalysis of the radical S-adenosylmethionine methylthiotransferase MiaB yields an intermediate with a [3Fe–4S]<sub>0</sub>-like auxiliary cluster. *Journal of the American Chemical Society* **142**, 1911–1924.



### 3.1. Formation de centre [2Fe-2S] sur les protéines d'échafaudages ISU

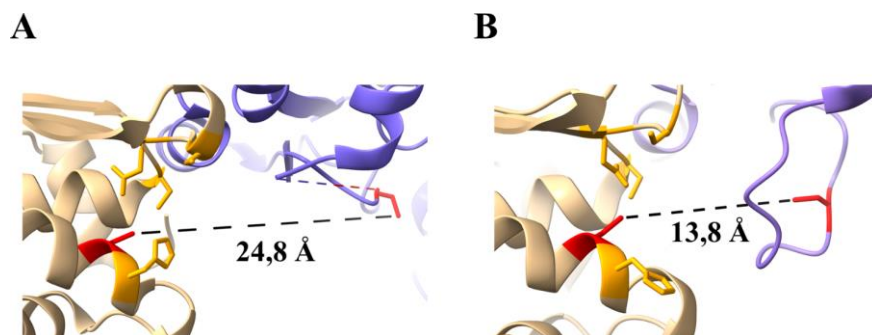
Concernant la formation *de novo* des centres [2Fe-2S], des études menées sur les orthologues d'AtISU1-3 présents chez l'homme et la souris ont permis d'éclaircir le mécanisme permettant l'assemblage *de novo* de centre Fe-S (figure 10).



**Figure 10. Schéma récapitulatif de la biogénèse d'un centre [2Fe-2S] par la machinerie ISC chez l'Homme**  
 Etape 1. Un groupement persulfure est généré sur la cystéine catalytique de NFS1. Etape 2. Le groupement persulfure est transféré de NFS1 à la cystéine du site actif de ISCU2. Etape 3. FDX2 réduit le persulfure en ion sulfure. Etape 4. La dimérisation médiée par la Tyr35 de ISCU2 permet la formation d'un centre [2Fe-2S] sur un dimère d'ISCU2. Etape 5. Le centre [2Fe-2S] est transféré à GLRX5 (Freibert *et al.*, 2021).

Comme mentionné dans la revue « *Iron-sulfur proteins in plant mitochondria: roles and maturation* », plusieurs étapes successives sont nécessaires à l'assemblage de centres Fe-S chez les eucaryotes. La première consiste en l'insertion d'un atome de fer au sein de la protéine d'échafaudage. Une étude de mutagenèse réalisée sur la protéine de souris ISCU a permis de déterminer que le fer serait lié par les résidus Cys35, Asp37, Cys61 et His103 (Fox *et al.*, 2018; Gervason *et al.*, 2019; Iannuzzi *et al.*, 2014) tous conservés au sein d'AtISU1-3. Les acteurs moléculaires permettant l'insertion du fer sont à l'heure actuelle encore inconnus. Néanmoins, l'implication d'une ou plusieurs protéines chaperons à métaux est suggérée afin de permettre à la fois un transfert ciblé et spécifique du fer vers la protéine d'échafaudage mais également d'extraire d'autres métaux potentiellement présents au niveau du site de fixation. Il a en effet été rapporté qu'après expression d'orthologues d'AtISU1-3 en système hétérologue et purification, une proportion importante (40 – 90 %) des protéines recombinantes obtenues contient un atome de zinc présent au même site de fixation que le fer (Fox *et al.*, 2018; Gervason *et al.*, 2019; Iannuzzi *et al.*, 2014; Ramelot *et al.*, 2004). L'occupation du site de fixation par du Zn/Fe permettrait le maintien d'une conformation spécifique de la protéine améliorant sa stabilité (Iannuzzi *et al.*, 2014; Ramelot *et al.*, 2004). Par la suite, l'apport de soufre est médié par la cystéine désulfurase pyridoxal-L-phosphate-dépendante (PLP-dépendante) NFS1. Les cystéine désulfurases sont des enzymes actives

sous forme dimérique qui catalysent la désulfuration PLP-dépendante de la cystéine induisant conjointement le relargage d'une alanine et la persulfuration de leur cystéine catalytique (figure 10). Chez les eucaryotes, NFS1 forme un complexe tri-partite stable incluant ISD11 une protéine LYRM (Leu Tyr Arg Motif) et ACP1 (*Acyl Carrier Protein 1*) qui a été appelé le complexe NIA<sub>2</sub> car il comprend deux sous-unités de chacune de ces protéines (Cai *et al.*, 2017; Cory *et al.*, 2017; Falekun *et al.*, 2021). La résolution de la structure de ce complexe chez l'Homme a permis de mettre en évidence son organisation et notamment que (i) la zone d'interaction entre ISD11 et NFS1 se situe au niveau d'une région hydrophobe de NFS1, expliquant l'effet stabilisateur d'ISD11 observée pour les isoformes présentes chez différents organismes, et (ii) qu'ACP1 n'est pas directement liée à NFS1 mais interagit avec ISD11. Le transfert de l'atome de soufre depuis la cystéine catalytique de NFS1 serait initié grâce à la présence d'un métal au sein d'ISCU, indépendamment de sa nature, induisant la persulfuration de la Cys104 (Gervason *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2020). Ce processus est mentionné dans la littérature comme un mécanisme dit « fer en premier » plutôt que « soufre en premier » (figure 10). Cette étape est accélérée par la présence de la frataxine (FXN) *via* un réarrangement conformationnel facilitant l'accès à la Cys104 et rapprochant la cystéine catalytique de NFS1 (figure 11), réfutant ainsi l'hypothèse initiale suggérant que la FXN pourrait être impliquée dans l'apport de fer à ISCU (Fox *et al.*, 2019).



**Figure 11. Représentation de la distance séparant la cystéine catalytique de NFS1 de la cystéine du site actif d'ISCU (A) en absence ou (B) en présence de la FXN**

NFS1 est représentée en violet, sa cystéine catalytique est représentée en rouge. ISCU est représentée en beige, la Cys104 est représentée en rouge, les résidus permettant la fixation du centre [2Fe-2S] (Cys35, Asp37, Cys61 et His103) sont représentés en jaune. Ces représentations sont issues des structures des complexes NIAU<sub>2</sub> (PDB : 6W1D) et NIAUF<sub>2</sub> (PDB : 6NZU) (Boniecki *et al.*, 2017; Fox *et al.*, 2019; Freibert *et al.*, 2021).

Enfin, la réduction spécifique de l'atome de soufre (S<sup>0</sup>) porté par ISCU en ion sulfure (S<sup>2-</sup>) est médiée par une ferrédoxine (FDX2 chez les animaux) (figure 10), elle-même réduite par une ferrédoxine NADPH-dépendante (FDXR). Une étude menée sur les deux FDX mitochondriales humaines a démontré leur spécificité fonctionnelle. Ainsi HsFDX1 est impliquée dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes, des acides biliaires et des vitamines A et D tandis que HsFDX2 est l'isoforme qui permet la formation des centres Fe-S (Schulz *et al.*, 2022). Cette spécificité fonctionnelle n'est cependant peut être pas transposable aux orthologues présents chez les plantes. En effet, les divergences de séquence entre HsFDX1 et HsFDX2 à l'origine de cette fonctionnalisation assez stricte ne sont pas retrouvées

dans les deux isoformes mitochondriales d'*A. thaliana* (AtmFDX1 et AtmFDX2) qui semblent toutes deux plus proches d'HsFDX2. Une fois l'ion sulfure libéré, il serait immédiatement capté par l'atome de fer résultant en la formation d'un complexe [1Fe-1S]. A noter que cette réduction n'est observée qu'en présence de fer. Il est donc envisagé que le fer présent au niveau de site de fixation pourrait servir de relais lors du transfert d'électron évitant ainsi une réduction du persulfure en absence de fer et expliquant le passage du fer de la forme Fe<sup>2+</sup> lié par ISCU à l'état Fe<sup>3+</sup> présent au sein du centre [2Fe-2S]<sup>2+</sup>. L'étape finale consiste en la dimérisation d'ISCU. Celle-ci serait permise par l'interaction entre les résidus Tyr35 de chaque monomère induisant ainsi le couplage des complexes [1Fe-1S] en centre [2Fe-2S]. Etonnamment, il a été suggéré que les monomères d'ISCU s'associent pour former le centre Fe-S proviennent de deux complexes NIAU<sub>2</sub> différents libérant ainsi un homodimère [2Fe-2S]:ISCU<sub>2</sub> et deux complexes NIA<sub>2</sub>U (figure 10) (Freibert *et al.*, 2021).

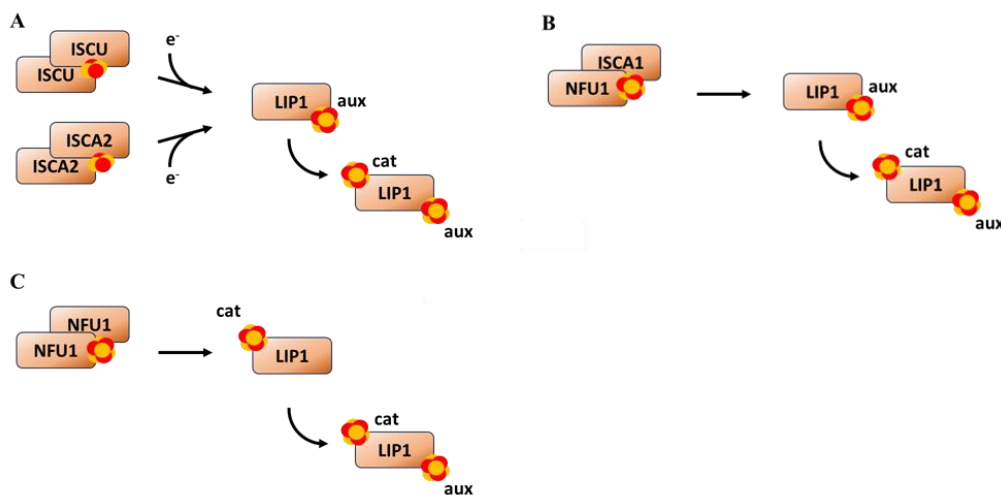
### 3.2. Formation et transfert des centres [4Fe-4S]

L'expression de GFP fusionnée aux peptides de transit des protéines NFU4 et NFU5 au sein de protoplastes d'*A. thaliana* a permis de confirmer leur localisation mitochondriale. De plus, l'analyse de différentes fractions cellulaires par Western-Blot indique une augmentation du signal spécifique de ces protéines à partir d'une fraction enrichie en protéines mitochondriales. Le fractionnement de la partie membranaire et soluble des mitochondries démontre quant à lui la présence des deux protéines dans la matrice mitochondriale (Przybyla-Toscano *et al.*, 2022). L'étude de mutants KO d'*A. thaliana nfu4* ou *nfu5* n'a permis de démontrer qu'un retard de la croissance racinaire chez certaines lignées. Néanmoins, la tentative d'obtention de doubles mutants n'exprimant ni *NFU4* ni *NFU5* par croisement des lignées simple mutants a permis de révéler le caractère indispensable de ces protéines. En effet leur absence est létale au stade embryonnaire. Ce résultat indique une redondance fonctionnelle entre les deux isoformes au moins à ce stade de développement (Przybyla-Toscano *et al.*, 2022). Afin d'analyser plus en profondeur les voies métaboliques impactées par l'absence des NFU mitochondriales, la létalité embryonnaire a été contournée par l'expression de *NFU4* sous le contrôle du promoteur ABI3 qui permet une expression spécifique lors de la formation de la graine et du développement embryonnaire. Bien que le développement végétatif des plantes reste fortement affecté, cela a notamment permis de mettre en évidence l'impact de l'absence des NFU mitochondriales sur les voies métaboliques dépendantes de cofacteurs lipoate (*i.e.* le cycle TCA, la photorespiration et le catabolisme des AA branchés) (Przybyla-Toscano *et al.*, 2022). Il est intéressant de noter que le mutant *grxs15<sup>KO</sup>*, complémenté grâce à l'expression du variant GRXS15 K83A déficient pour sa capacité à lier un centre Fe-S (par la suite noté *grxs15<sup>K83A</sup>*), présente le même phénotype (Moseler *et al.*, 2021). Cela se traduit notamment par un défaut d'incorporation de lipoate dans les sous-unités E2 des complexes PDH, oxoglutarate déshydrogénase (OGDH) et  $\alpha$ -cétoacide à chaîne branchée déshydrogénase (BCKDH) ainsi que sur la sous-unité H du complexe GDC résultant en une accumulation des substrats associés à

chacun de ces complexes, respectivement le pyruvate, l' $\alpha$ -cétoglutarate, les acides aminés branchés (isoleucine, leucine et valine) et la glycine. Dans les deux cas, la diminution de l'activité de GRXS15 et de NFU4/5 semble impacter spécifiquement la lipoylation des protéines. En effet l'activité de l'aconitase mitochondriale, généralement utilisée comme protéine rapportrice d'un défaut d'incorporation de centre [4Fe-4S], n'est pas impactée chez le mutant *grxs15<sup>K83A</sup>* (Moseler *et al.*, 2021). Des tests d'interactions binaires *in vivo* en levure (Y2H) et *in planta* (BiFC) ont permis de démontrer que NFU4 et NFU5 sont capables d'interagir avec la lipoate synthase LIP1, responsable de la maturation de l'acide octanoïque en acide lipoïque dans la mitochondrie (Przybyla-Toscano *et al.*, 2022). LIP1 est une enzyme dite à radical SAM, qui lie deux centres [4Fe-4S]. Un premier centre [4Fe-4S], appelé par la suite [4Fe-4S]<sub>cat</sub>, est nécessaire pour la catalyse en effectuant le clivage d'une molécule de SAM, et un second centre [4Fe-4S] dit auxiliaire permet l'apport des deux atomes de soufre nécessaires pour la conversion de l'acide octanoïque en acide lipoïque, et sera appelé par la suite [4Fe-4S]<sub>aux</sub>. L'hypothèse permettant d'expliquer les similarités phénotypiques très spécifiques des mutants *nfu4 nfu5* et *grxs15* serait l'existence d'une voie de formation de centre [4Fe-4S] impliquant spécifiquement ces protéines.

De récentes études *in vitro* réalisées sur les protéines humaines ont tenté de décrypter les mécanismes moléculaires permettant la maturation de LIAS, l'homologue de LIP1 présent chez l'Homme (Hendricks *et al.*, 2021; Saudino *et al.*, 2022). Différents donneurs potentiels de centre [2Fe-2S] ont été testés sur la base des phénotypes associés à leur absence chez l'Homme (*ie MMDS et NKH syndrome*) (figure 12). Les résultats obtenus démontrent la capacité des complexes [2Fe-2S]:HsISCU<sub>2</sub> et [2Fe-2S]:HsISCA<sub>2</sub> à transférer leur centre Fe-S au site de fixation du centre [4Fe-4S]<sub>cat</sub> en présence de réducteur chimique (*ie* DTT, dithionite de sodium et GSH), probablement nécessaire au couplage réductif des centres [2Fe-2S]<sup>2+</sup> liés par les protéines donatrices. Ce transfert est dépendant de la présence du centre [4Fe-4S]<sub>aux</sub> sur LIP1. Aucun des donneurs testés n'a été capable de transférer son centre Fe-S au site auxiliaire (Hendricks *et al.*, 2021). La seconde étude a permis de mettre en évidence la capacité de complexe [4Fe-4S]:ISCA1:NFU1 à maturer le centre [4Fe-4S]<sub>cat</sub> de la LIAS en présence ou en absence du centre [4Fe-4S]<sub>aux</sub> (Saudino *et al.*, 2022). Cette étude ne remet pas en question la possibilité d'un transfert provenant d'un complexe [4Fe-4S]:NFU<sub>1</sub><sub>2</sub>, tel qu'il l'a été proposé chez la levure (Melber *et al.*, 2016), mais suggère l'existence d'une voie alternative potentielle impliquant ISCA1. Cette hypothèse est supportée par l'observation de la formation d'un complexe tri-partite [4Fe-4S]:ISCA1:ISCA2:NFU1 dont le centre [4Fe-4S] est lié par ISCA1 et NFU1 après titration d'apoNFU1 dans une solution contenant le complexe [4Fe-4S]:ISCA1:ISCA2 à un rapport 1/1 (Suraci *et al.*, 2021). La raison pour laquelle ISCA2 n'est pas relarguée en solution après son remplacement dans la sphère de coordination du centre Fe-S par NFU1 reste cependant à déterminer. Cela pourrait être dû aux concentrations protéiques élevées utilisées en RMN, rendant également possible l'observation d'un complexe tri-partite ISCA1:ISCA2:NFU1 ne liant pas de centre Fe-S qui n'est pas observable à plus faible concentration (Suraci *et al.*, 2021). On pourrait également émettre

l'hypothèse qu'une titration d'apoNFU1 avec le complexe [4Fe-4S]<sub>2</sub>:ISCA1:ISCA2 à un rapport 2/1 permettrait la formation d'un complexe [4Fe-4S]<sub>2</sub>:NFU1<sub>2</sub> avec relargage d'un apo-complexe ISCA1:ISCA2. L'existence *in vivo* et la fonctionnalité d'un hétéro-complexe [4Fe-4S]<sub>2</sub>:ISCA1:NFU1 restent incertaines. En effet, ce type de complexe devrait plutôt représenter un intermédiaire dans le transfert de centres Fe-S entre un holo-hétérodimère ISCA1:ISCA2 et un apo-dimère de NFU. Alors que ces expériences permettaient de conclure sur l'implication des protéines NFU pour la maturation du centre [4Fe-4S]<sub>cat</sub> mais pas pour celle du centre [4Fe-4S]<sub>aux</sub> lié à la LIAS humaine, de récentes études ont démontrés une interaction stable entre NFU1 et LIAS permettant de remplacer le centre [4Fe-4S]<sub>aux</sub> de LIAS lors de la synthèse de lipoate *in vitro* (Warui *et al.*, 2022). Cette étude montre également que l'ajout de BOLA3 ne permet pas d'augmenter le nombre de cycles réactionnels. Il serait cependant intéressant de tester si BOLA3 est capable de se greffer au complexe LIAS-NFU1 et de mesurer l'effet de sa présence sur la cinétique de formation de cofacteur lipoate.



**Figure 12. Voies de maturation potentielles de la lipoate synthase**

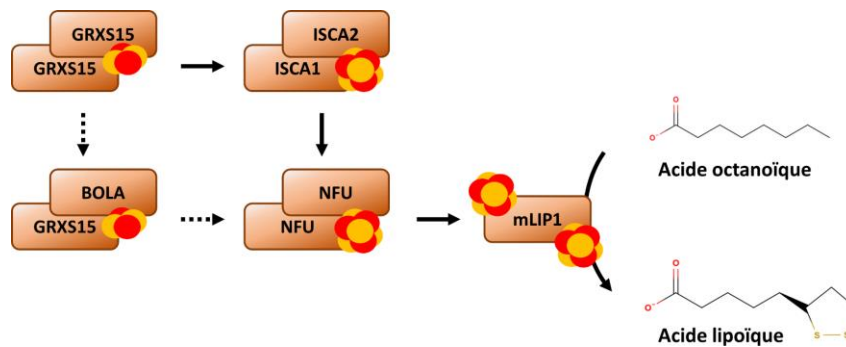
La maturation du site catalytique de la lipoate synthase serait permise par les complexes homodimériques ISCU<sub>2</sub> et ISCA2<sub>2</sub> grâce à un apport d'électrons (A) ou par un hétérocomplexe ISCA1:NFU1 liant un centre [4Fe-4S] (B). La maturation du centre auxiliaire de la lipoate synthase serait quant à elle permise par le complexe homodimérique NFU1<sub>2</sub> liant un centre [4Fe-4S] (C).

## 4. Objectifs du projet

Ma thèse s'inscrit dans la continuité du projet de recherche mené par le Dr. Jonathan Przybyla-Toscano sous la direction du Pr. Nicolas Rouhier et du Dr. Jérémy Couturier. Le travail réalisé par le Dr. Przybyla-Toscano avait permis d'établir une première carte du réseau des interactions moléculaires en jeu au sein de la machinerie d'assemblage des centres Fe-S mitochondriale ISC. Ses efforts se sont notamment portés sur la caractérisation biochimique et fonctionnelle des protéines GRXS15, ISCA et NFU et leur implication dans la formation et le transfert des centres [4Fe-4S] jusqu'aux accepteurs finaux. Les analyses en spectroscopie ont été réalisées essentiellement en collaboration avec l'équipe du

Pr. Michael K. Johnson du département de chimie et de l'étude et métalloenzyme de l'Université de Géorgie à Athens mais celui-ci a pris sa retraite au démarrage du projet. Les résultats disponibles au démarrage de ce travail indiquaient la capacité de GRXS15 à lier un centre [2Fe-2S] et à le transférer à la ferrédoxine mitochondriale FDX1 (Moseler *et al.*, 2015) mais aussi vers un hétérodimère ISCA1a-ISCA2 pour la formation d'un centre [4Fe-4S] après couplage réductif en présence de GSH (Azam *et al.*, 2020a). De plus, les analyses réalisées par le Dr. Anna Moseler et le Pr. Andreas Meyer du laboratoire « *Chemical Signalling* » (Bonn, Allemagne) sur le mutant *grxs15* d'*Arabidopsis thaliana*, avaient révélé le caractère indispensable de cette protéine chez les plantes, en lien avec la maturation de la lipoate synthase (Moseler *et al.*, 2015). Ainsi, le travail de thèse que j'ai réalisé s'est inscrit dans le cadre d'un projet bilatéral (ANR-DFG, MitoGlu) obtenu en 2018 entre les deux laboratoires sur l'étude fonctionnelle de la GRXS15. En parallèle, Luca Pedroletti a ainsi démarré une thèse sous l'encadrement du Pr. A. Meyer pour les analyses génétiques et physiologiques de lignées d'*Arabidopsis thaliana* affectées pour GRXS15.

Les objectifs de ce projet se sont déclinés en plusieurs axes. L'interaction de GRXS15 avec les membres connus de la machinerie mitochondriale d'assemblage des centres Fe-S a été au centre de ce projet. La capacité de la protéine à maturer les FDX mitochondriales ainsi qu'à transférer son centre Fe-S aux protéines ISCA ayant déjà été démontrée (Azam *et al.*, 2020a; Moseler *et al.*, 2015), je me suis focalisé sur son interaction avec les protéines BOLA. En effet, les données obtenues au travers de l'étude des protéines de l'Homme et de levure suggèrent une implication de ces dernières dans la maturation de la lipoate synthase mitochondriale (Melber *et al.*, 2016; Uzarska *et al.*, 2016). L'existence d'une voie alternative permettant la formation de centre [4Fe-4S] impliquant GRXS15, les protéines BOLA et les protéines NFU a donc été envisagée, et confortée en cours de thèse par des données obtenues avec les isoformes humaines (Nasta *et al.*, 2020). L'implication d'une protéine BOLA au travers de cette potentielle voie alternative pourrait ainsi relier les phénotypes observés chez les mutants de levure, les défauts d'incorporation de cofacteur lipoate du mutant *AtGRXS15<sup>K83A</sup>* (Moseler *et al.*, 2021) et l'implication des protéines NFU dans la maturation de la lipoate synthase (Przybyla-Toscano *et al.*, 2022) (figure 13).



**Figure 13. Représentation schématique du processus de maturation de LIP1 basé sur les évidences issues des modèles établis chez les plantes, l'humain et la levure**

Le second objectif a été la caractérisation des propriétés structurales et redox de la protéine. Peu après l'initiation de ce projet, plusieurs études portant sur la comparaison des GRX de classe I et de classe II ont révélé certaines spécificités structurales à l'origine des différences fonctionnelles observées entre les isoformes de ces deux classes (Begas *et al.*, 2017; Liedgens *et al.*, 2020; Trnka *et al.*, 2020). L'extension de la boucle précédant l'hélice  $\alpha$  contenant le site actif des GRX de classe II permettrait notamment une modification de l'interaction entre celles-ci et le GSH améliorant leur capacité transférer leur centre Fe-S (Trnka *et al.*, 2020). De plus, deux sites de reconnaissance du GSH ont été proposés, un site d'échafaudage et un site activateur. Le site d'échafaudage permettrait la reconnaissance du substrat glutathionylé et donc la demi-réaction oxydative, tandis que le site activateur permettrait quant à lui le recrutement d'une molécule de GSH afin de réduire la GRX glutathionylée et donc permettre la demi-réaction réductrice (Begas *et al.*, 2017; Liedgens *et al.*, 2020). Ces résultats nous ont menés à étudier la sensibilité de GRXS15 à différents agents oxydants retrouvés dans les mitochondries ainsi que la capacité des systèmes de réduction mitochondriaux à réduire les formes d'oxydation préalablement mises en évidence.

Le troisième objectif visait à effectuer une analyse structure-fonction de GRXS15 en utilisant des expériences de complémentation fonctionnelle en levure. Des résultats précédemment obtenus lors de l'étude des GRX de classe II de peuplier ont démontré l'incapacité de PtGRXS15 à compléter le mutant de levure *grx5* contrairement aux GRX de classe II cytosolique et chloroplastiques (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). L'objectif de cet axe a donc été d'étudier les spécificités de GRXS15 d'*A. thaliana* à l'origine de cette divergence fonctionnelle.

Enfin, le dernier objectif était d'étudier le réseau d'interaction moléculaire de GRXS15. Les possibilités d'interactions binaires impliquant GRXS15 et les autres membres de la machinerie ISC ont été précédemment explorées *via* les méthodes du double hybride en levure et de la complémentation de fluorescence (Przybyla-Toscano, 2017). Une expérience de co-immunoprécipitation a donc été réalisée afin de permettre la détection de potentielles interactions avec des partenaires jusqu'alors non considérés, mais également de celles impliquant la formation de complexes multiprotéiques.





---

# Matériels et méthodes

---

## II. Matériels et méthodes

### 1. Clonage par PCR

#### 1.1. Amplification de fragments d'ADN

Cette première étape consiste à amplifier une séquence d'acide désoxyribonucléique (ADN) sur le principe d'une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide d'une ADN polymérase haute-fidélité (Iproof, Biorad). Les fragments d'ADN d'intérêt ont été amplifiés à partir d'ADNc obtenus par transcription inverse d'ARNm de feuilles de plants sauvages d'*A. thaliana*. Alternativement, certaines amplifications ont été réalisées à partir d'un plasmide contenant la séquence d'intérêt. La réaction est effectuée dans un volume de 50  $\mu$ L contenant chaque base nucléotidique (dNTP ; 160  $\mu$ M), une matrice (environ 40 ng), les amorces sens et anti-sens spécifiques du gène d'intérêt (200 nM), l'ADN polymérase (0,5 U) et le tampon associé (1 X). Le mélange réactionnel est alors soumis à un cycle thermique de 5 étapes distinctes. Dans un premier temps, une température de 98°C est appliquée durant 30 sec permettant la dénaturation initiale de la matrice d'ADN. Les étapes suivantes sont répétées 35 fois, la dénaturation de l'ADN est poursuivie pendant 10 sec à 98°C puis l'hybridation des amorces avec la matrice est permise en réduisant la température à environ 54°C (cette température pouvant varier en fonction des amorces utilisées pour la réaction afin d'améliorer la spécificité de fixation de ces dernières), enfin la polymérisation du brin d'ADN est effectuée à 72°C pendant 30 sec par kb. Une étape de polymérisation finale est réalisée à 72°C pendant 10 min.

#### 1.2. Purification de fragment d'ADN sur gel

A la suite de l'amplification par PCR, 10  $\mu$ L de tampon de charge 6 X (Fermentas) sont ajoutés au mélange réactionnel ( $V_f = 60 \mu$ L) qui est ensuite déposé sur gel d'agarose 1 % (m/v) contenant du bromure d'éthidium permettant la visualisation de l'ADN par illumination à la lumière UV. La migration est réalisée à 100 V. Cette étape permet à la fois la vérification de la taille du fragment d'ADN amplifié ainsi que sa purification en cas de résultat positif. La bande d'ADN d'intérêt est purifiée à l'aide du kit « illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit » (GE Healthcare) en suivant les recommandations du fournisseur. Brièvement, la bande d'ADN est découpée du gel d'agarose, dissoute à 60°C dans un tampon permettant la fixation de l'ADN sur une colonne fournie dans le kit et l'échantillon est déposé sur celle-ci. Une étape de lavage est réalisée suivie de l'élution de l'ADN ainsi purifié dans de l'eau stérile.

#### 1.3. Digestion des fragments d'ADN et ligature au sein d'un plasmide

Afin de permettre l'insertion du fragment d'ADN amplifié dans le vecteur de destination, ces derniers doivent être digérés par les enzymes de restriction appropriées. Ainsi, la totalité de l'insert et 1,5  $\mu$ g de plasmide sont digérés séparément dans un volume de 90  $\mu$ L contenant un tampon de digestion

« fast digest » (1 X) ainsi que les enzymes de restriction appropriées (1 U de chaque enzyme pour l'insert et 1,5 U de chaque enzyme pour le plasmide). La réaction est alors réalisée à 37°C pendant 1 h puis l'ADN digéré est purifié à l'aide du kit « illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit » (GE Healthcare), en omettant la phase de dissolution à 60°C. L'insert est alors élué dans 35 µL d'eau stérile et le plasmide dans 25 µL pour obtenir une concentration de l'ordre de 50 ng/µL.

La ligation de l'insert au sein du plasmide est réalisée dans un volume de 20 µL contenant du tampon de ligation (1 X), une « T4 ligase » (Fermentas ; 1 U), 15 µL d'insert digéré et 1 µL de plasmide digéré soit environ 50 ng. La ligation est réalisée sur la nuit à 4°C puis conservée à -20°C.

#### 1.4. Transformation bactérienne par choc thermique

Afin de sélectionner les plasmides recombinants, une partie du mélange de ligation (7 µL) est utilisée pour transformer des bactéries *E. coli* (DH5α) thermo-compétente. Le mélange est placé à 4°C pendant 30 min avant de subir un choc thermique à 42°C pendant 35 sec induisant une déstabilisation des membranes permettant l'incorporation du plasmide dans les bactéries. Il est ensuite placé à 4°C pendant 5 min avant d'ajouter 500 µL de milieu SOC (Super Optimal growth with Catabolite repression) permettant une meilleure régénération des bactéries. Les bactéries sont alors incubées à 37°C pendant 1 h à 150 rpm. Après centrifugation (Eppendorf F-45-12-11 ; 12000 x g ; 1 min ; température ambiante), le culot est remis en suspension dans environ 150 µL avant étalement sur boîte de Petri contenant 30 mL de milieu LB Agar (35 g/L) en présence de 50 µg/mL de l'antibiotique permettant la sélection des colonies bactériennes effectivement transformées. La boîte de Petri est ensuite placée à 37°C pendant une nuit.

#### 1.5. Vérification de l'insertion du fragment d'ADN d'intérêt et séquençage

Par la suite, des PCR sur colonies sont réalisées dans le but de vérifier que les bactéries résistantes à l'antibiotique ont intégré un plasmide contenant la séquence d'intérêt. Les colonies sélectionnées sont individuellement testées par PCR d'un volume de 20 µL contenant chaque base nucléotidique (dNTP ; 160 µM), les amorces sens et anti-sens spécifique du gène d'intérêt (200 nM), du MgCl<sub>2</sub> (2 mM), l'ADN polymérase (GoTaq, Promega ; 0,25 U) et le tampon associé (1 X). Le cycle PCR est alors débuté par une étape de lyse des cellules et de dénaturation de l'ADN libéré à une température de 95°C. Les étapes suivantes (dénaturation, hybridation, polymérisation) sont répétées 35 fois et sont similaires à celles appliquées lors de l'amplification initiale du fragment d'ADN (section 1.1.) à la différence du temps d'élongation qui est de 60 s par kb. Enfin une étape de polymérisation finale est réalisée à 72°C pendant 10 min. La taille des séquences d'ADN amplifiées est ensuite vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (m/v), la migration est réalisée à 100 V.

Un clone positif est ensuite mis en culture dans 5 mL (LB ; 20 g/L) supplémentée avec l'antibiotique adéquat (50 µg/mL) et incubée sur la nuit à 37°C sous agitation (150 rpm). L'extraction de l'ADN plasmidique est ensuite réalisée grâce au kit « illustra plasmidPrep Mini Spin Kit » (GE Healthcare) en suivant les recommandations du fournisseur puis l'ADN plasmidique est élué dans 35 µL d'eau stérile. La concentration en ADN est déterminée à l'aide du spectrophotomètre « DeNovix DS-11 ». La présence de l'insert est vérifiée en digérant 500 ng de plasmide dans un volume final de 20 µL contenant un tampon de digestion « fast digest » (1 X) ainsi que les enzymes de restriction utilisées pour le clonage (0,5 U de chaque enzyme). Le mélange est incubé 15 min à 37°C puis est soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (m/v), la migration est réalisée à 100 V. Après confirmation de la présence de l'insert à la taille attendue, 15 µL de plasmide (100 ng/µL) sont envoyés au séquençage afin de vérifier l'intégrité de la séquence nucléotidique.

## 2. Production hétérologue de protéines recombinantes chez *E. coli* et purification

### 2.1. Transformation des bactéries par électroporation

La souche bactérienne *E. coli* BL21 (DE3) électro-compétente a été utilisée pour la production de protéines recombinantes. Cette souche permet l'expression de gènes placés sous le contrôle du promoteur T7 grâce à une insertion chromosomique comportant le gène codant l'ARN polymérase du phage T7 sous le contrôle du promoteur *lacUV5* inductible à l'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Le biais d'usage des codons pouvant impacter l'expression de gènes de plantes au sein de cellules bactériennes, l'utilisation de souches comportant un plasmide permettant de rétablir une expression adéquate des ARNt concernés a pu s'avérer nécessaire. La surexpression de certaines protéines pouvant s'avérer toxique pour la cellule bactérienne, la souche C41 (DE3) s'est avérée bénéfique notamment pour l'expression de GRXS15. Cette souche contient une mutation au sein du promoteur *lacUV5* diminuant l'expression de l'ARN polymérase du phage T7. Cela a pour effet de diminuer le niveau d'expression du gène codant pour la protéine d'intérêt permettant à la fois de diminuer la toxicité induite par la surproduction de la protéine recombinante mais également de permettre un meilleur repliement de celle-ci. Les souches décrites ci-dessus sont celles ayant permis d'obtenir les meilleurs rendements concernant les protéines étudiées, mais l'expression a également été testée dans d'autres souches détaillées ci-dessous.

**Tableau 1 : Souches d'*E. coli* utilisées pour la production de protéines recombinantes au cours de cette étude**

	<b>Description</b>
BL21 (DE3)	Déficiente pour les protéases <i>lon</i> et <i>ompT</i>
BL21 (DE3) pSBET	Déficiente pour les protéases <i>lon</i> et <i>ompT</i> , contient le plasmide pSBET contenant les séquences codantes pour les ARNt reconnaissant les codons AGG et AGA
BL21 (DE3) pCDF Duet GroEL-GroES	Déficiente pour les protéases <i>lon</i> et <i>ompT</i> , contient un plasmide pCDF contenant les séquences codantes pour les protéines chaperons GroEL et GroES d' <i>E. coli</i>
BL21 (DE3) pCDF Duet ISC-SAM	Déficiente pour les protéases <i>lon</i> et <i>ompT</i> , contient un plasmide pCDF contenant les séquences codantes pour l'opéron ISC et la SAM synthase d' <i>E. coli</i>
C41(DE3) pSBET	Déficiente pour les protéases <i>lon</i> et <i>ompT</i> , permet la production de protéines cytotoxique, contient le plasmide pSBET contenant les séquences codantes pour les ARNt reconnaissant les codons AGG et AGA
C41 (DE3) pRARE2	Déficiente pour les protéases <i>lon</i> et <i>ompT</i> , permet la production de protéines cytotoxique, contient le plasmide pRARE2 contenant les séquences codantes pour les ARNt reconnaissant les codons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, CGG et GGA

La transformation bactérienne par électroporation est initiée par l'ajout d'environ 20 ng de plasmide à une suspension de bactéries compétentes (40 µL). Un choc électrique de 5 millisecondes à 2800 V est ensuite appliqué à la cuve d'électroporation, induisant ainsi la déstabilisation des membranes et permettant l'insertion du plasmide. La solution bactérienne est alors reprise avec 500 µL de milieu LB (20 g/L) et incubée 30 min à 37°C sous agitation (150 rpm). Environ 200 µL sont alors étalés sur boîte de Petri contenant 30 mL de milieu LB Agar (35 g/L) en présence de 50 µg/mL du ou des antibiotique(s) permettant la sélection des colonies bactériennes effectivement transformées. La boîte de Petri est ensuite incubée à 37°C pendant une nuit.

## 2.2. Production de protéines recombinantes

Une culture de 3 mL de milieu LB liquide (20 g/L) supplémenté avec les antibiotiques adéquats (50 µg/µL) estensemencée à partir d'une colonie bactérienne puis incubée pendant environ 4 h à 37°C sous agitation (150 rpm). Par la suite, 200 µL de culture sont prélevés et conservés à 4°C pour un ensemencement ultérieur. La production de la protéine d'intérêt est induite dans le reste de la culture bactérienne par l'ajout de 100 µM IPTG. La culture est incubée à 37°C sous agitation (150 rpm) 5 h supplémentaires puis 150 µL sont prélevés et centrifugés (Eppendorf F-45-12-11 ; 12000 x g ; 1 min ; température ambiante). Le surnageant est éliminé et le culot repris dans 20 µL de tampon de charge Laemmli réducteur. L'échantillon est chauffé 10 min à 95°C avant d'être déposé sur gel polyacrylamide 15 % (v/v) dénaturant, la migration est réalisée à 180 V. Dans le cas où la surexpression de la protéine d'intérêt est confirmée, 200 mL de milieu LB liquide (20 g/L) supplémentés avec les antibiotiques

adéquats (50 µg/mL) sont ensemencés à partir des 200 µL de culture bactérienne préalablement conservés à 4°C. La culture est alors incubée pendant une nuit à 37°C sous agitation (150 rpm). Le lendemain matin, 160 mL de culture sont prélevés et utilisés pour ensemencés 3,2 L (4 fois 800 mL) de milieu LB liquide (20 g/L) supplémenté avec les antibiotiques adéquats (50 µg/mL). Ces cultures sont alors incubées à 37°C sous agitation (150 rpm). Lorsqu'une densité optique (DO) à 600 nm de 0,6 est atteinte, la production de la protéine d'intérêt est initiée par l'ajout de 100 µM d'IPTG. Les cultures bactériennes sont alors incubées 5 h supplémentaires à 37°C sous agitation (150 rpm). Alternativement, la production de protéines chaperons favorisant un repliement optimal de la protéine recombinante peut être induite avant l'ajout d'IPTG *via* l'ajout de 0,5 % (v/v) d'éthanol (EtOH) conjointement à un refroidissement de la culture à une température de 4°C pendant 2 h. Dans ce cas, après l'ajout d'IPTG, les cultures bactériennes sont incubées à une température comprise entre 20°C et 30°C, en fonction de la protéine produite, sous agitation (150 rpm) sur la nuit (environ 16 h). Les cellules sont récoltées par centrifugation (Beckman Coulter JLA 8.1000 ; 20 min ; 6200 x g ; température ambiante) et chaque culot cellulaire est repris dans 3 mL de tampon TNE composé de 30 mM Tris-HCl (pH 8,0 à 4°C), 200 mM NaCl et 1 mM d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA). Dans le cas où la protéine recombinante comporte une étiquette poly-histidine, le tampon TNI<sub>10</sub> utilisé pour la resuspension des culots bactériens est composé de 50 mM Tris-HCl (pH 8,0 à 4°C), 300 mM NaCl et 10 mM imidazole. La suspension bactérienne est alors conservée à -20°C jusqu'à utilisation.

### 2.3. Lyse des cellules

La suspension bactérienne est décongelée et 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF) est ajouté afin d'inhiber l'activité des protéases à sérine, puis les cellules bactériennes sont lysées par sonication (amplitude 20 % ; 3 fois 1 min). A partir de cette étape, les échantillons protéiques sont systématiquement conservés à 4°C sur glace. Les protéines solubles et insolubles sont séparées par centrifugation (Beckman Coulter JA 25.50 ; 30 min ; 39000 x g ; 4°C). Les protéines insolubles et membranaires présentes dans le culot sont resuspendues dans 8 mL de tampon TNE afin d'analyser la proportion de protéine recombinante présente dans cette fraction. Le traitement appliqué au surnageant contenant les protéines dépend de la présence ou de l'absence d'étiquette poly-histidine en région N- ou C-terminale de la protéine recombinante.

### 2.4. Purification de protéines recombinantes non étiquetées

La purification de protéines non étiquetées est réalisée en 3 étapes successives. Dans un premier temps, une précipitation différentielle au sulfate d'ammonium est réalisée afin d'éliminer une partie des protéines endogènes d'*E. coli*. Cette étape est suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille et d'une chromatographie échangeuse d'anion. Une dernière étape de chromatographie d'exclusion de taille automatisée est effectuée afin de déterminer l'état d'oligomérisation (structure quaternaire) de la

protéine purifiée. Selon le type de colonnes utilisées, cela permet éventuellement d'éliminer certains contaminants résiduels potentiellement présents.

#### 2.4.a. Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium

Afin de réaliser une précipitation au sulfate d'ammonium, la solution protéique est saturée à 40 % en sulfate d'ammonium, induisant une déstabilisation de la sphère d'hydratation (phénomène également appelé « salting out ») des protéines et par conséquent la précipitation des protéines les moins hydratées qui sont alors récoltées par centrifugation (Beckman Coulter JA 25.50 ; 30 min ; 39000 x g ; 4°C). Ce premier palier de saturation étant choisi arbitrairement, il peut être ajusté selon les propriétés de la protéine purifiée. Le surnageant est ensuite amené à 80 % de saturation en sulfate d'ammonium, permettant la précipitation des protéines restantes qui sont également récoltées par centrifugation dans les mêmes conditions. Les culots obtenus sont resuspendus dans 8 mL de tampon TNE et leur contenu protéique est analysé par migration sur gel polyacrylamide 15 % (v/v) en conditions dénaturantes et réductrices. La fraction contenant la majeure partie de la protéine d'intérêt est conservée pour la suite de la purification.

#### 2.4.b. Chromatographie d'exclusion de taille

L'échantillon protéique est déposé sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille composé de résine d'acrylamide-agarose (ACA). Ce type de chromatographie permet la séparation des protéines en fonction de leur volume apparent en lien avec (i) la masse moléculaire de la protéine déduite à partir de sa séquence en acides aminés, (ii) sa structure tridimensionnelle et (iii) sa structure quaternaire. Ces paramètres influencent le choix de la résine utilisée en lien avec son domaine de fractionnement. Les résines ACA 34 et ACA 44 (Pall-BioSeptra) permettent une séparation résolutive des protéines allant respectivement de 350 à 20 kDa et 130 à 10 kDa.

Les résines sont préalablement équilibrées dans du tampon TNE avant dépôt de l'échantillon protéique. Une fois les fractions collectées, le chromatogramme de l'échantillon est établi par mesure de l'absorbance à 280 nm et, si possible, de l'absorbance spécifique d'un éventuel cofacteur (centre Fe-S, FAD) de chaque fraction. Le contenu protéique des fractions d'intérêt est ensuite analysé sur gel polyacrylamide 15 % (v/v) en conditions dénaturantes et réductrices. Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont alors regroupées et concentrées par ultrafiltration sous pression d'azote (cellule Amicon, membrane YM10) jusqu'à obtenir un volume de solution protéique d'environ 5 mL.

#### 2.4.c. Chromatographie échangeuse d'anions

Ce type de chromatographie permet la séparation des protéines en fonction de leur charge. La résine utilisée est composée d'agarose auquel sont couplés des groupements amines quaternaires (Q-Sepharose) permettant la rétention des molécules chargées négativement.

Afin de permettre la fixation des protéines contenues dans l'échantillon issu de la chromatographie d'exclusion de taille, ce dernier est dilué dans du tampon TE composé de 30 mM Tris-HCl (pH 8,0 à 4°C) et 1 mM EDTA afin de diminuer la concentration de NaCl jusqu'à environ 10-20 mM puis l'échantillon est déposé sur la colonne. Une étape de lavage avec 50 mL de tampon TE est réalisée afin d'éliminer les protéines non retenues puis un gradient croissant en NaCl (0 – 400 mM) est appliqué afin d'éluer progressivement les protéines retenues. La force de rétention d'une protéine dépend ici du pH du tampon utilisé modulant la charge globale des protéines contenues dans l'échantillon en fonction de leur point isoélectrique. Le chromatogramme de l'échantillon est à nouveau établi de la même manière que précédemment et le contenu protéique des fractions d'intérêt est analysé sur gel polyacrylamide 15 % (v/v) en conditions dénaturantes et réductrices. Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont alors rassemblées et concentrées par ultrafiltration sous pression d'azote (cellule Amicon, membrane YM10) jusqu'à obtenir un volume d'environ 1 mL.

#### 2.4.d. Chromatographie d'exclusion de taille automatisée

La dernière étape consiste à déposer l'échantillon protéique obtenu sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille, cette fois couplée à un système d'automatisation « Aktä purifier » installé au sein d'une enceinte réfrigérée. Ce système permet d'uniformiser les conditions de migration (débit de tampon, température) ainsi que la mesure en temps réel de l'absorbance à plusieurs longueurs d'onde en sortie de colonne. Les colonnes utilisées en fin de purification sont dites « préparatives » et permettent le dépôt d'un volume maximal de 1 mL. Les colonnes dites « analytiques » servent seulement à analyser l'état d'oligomérisation à partir de quantité et volume moindres (300 µg et 300 µL) sans chercher à conserver la protéine. Deux résines sont disponibles au laboratoire permettant d'adapter le domaine de fractionnement en fonction de la protéine d'intérêt. Ainsi, les colonnes Superdex S75 et Superdex S200 (GE Healthcare) permettent respectivement une séparation résolutive des protéines/complexes protéiques allant respectivement de 70 kDa à 3 kDa et de 600 kDa à 10 kDa. Les colonnes sont généralement équilibrées dans du tampon 30 mM Tris-HCl (pH 8,0 à 4°C) 200 mM NaCl. La standardisation des conditions de migration permet d'estimer la masse moléculaire des protéines/complexes protéiques analysé(e)s en fonction de leur volume d'élution grâce à une courbe de calibration obtenue par migration de protéines de référence (thyroglobuline, apoferritine, β amylase, alcool déshydrogénase, albumine de sérum bovin, anhydrase carbonique, cytochrome c, aprotinine ; Biorad) sur une résine donnée. Cette étape permet donc de distinguer et d'éliminer des agrégats pouvant notamment provenir des étapes de concentration et de dialyse réalisées auparavant. Le contenu protéique des fractions d'intérêt est vérifié sur gel polyacrylamide 15 % (v/v) en conditions dénaturantes et réductrices. Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont alors regroupées et concentrées par ultrafiltration sous pression d'azote (cellule Amicon, membrane YM10) puis conservées dans du tampon 30 mM Tris-HCl (pH 8,0 à 4°C) 200 mM NaCl à -20°C jusqu'à utilisation. Lorsque la protéine s'avère



sensible aux étapes de congélation/décongélation, celle-ci est alors conservée dans du tampon 30 mM Tris-HCl pH 8,0 200 mM NaCl 40 % glycérol.

## 2.5. Purification de protéines recombinantes étiquetées

Les protéines étiquetées purifiées lors de cette étude comportent une étiquette poly-histidine (6-His) insérée à l'extrémité N-terminale. L'affinité entre les résidus histidine et les cations nickel permet la fixation de la protéine sur une résine IMAC (Immobilised Metal Affinity Chromatography ; Qiagen) accélérant et facilitant le processus de purification par rapport au protocole classique décrit précédemment.

### 2.5.a. Chromatographie d'affinité

La résine IMAC est équilibrée dans du tampon TNI<sub>10</sub>, la présence d'imidazole en faible concentration permet de limiter la rétention aspécifique de protéines présentant une affinité résiduelle pour le nickel. En effet, l'imidazole présente une structure similaire à l'histidine lui permettant d'entrer en compétition avec les autres molécules présentes pour la fixation au nickel. La fraction soluble obtenue après centrifugation du lysat bactérien est déposée sur la colonne grâce à une pompe péristaltique et un lavage avec du tampon TNI<sub>20</sub> est réalisé jusqu'à élimination totale des molécules retenues de manière aspécifique. Lorsqu'il n'y a plus d'absorbance en sortie de colonne, l'élution des protéines retenues est initiée grâce à du tampon TNI<sub>250</sub>. L'échantillon protéique ainsi obtenu est alors concentré par ultrafiltration sous pression d'azote (cellule Amicon, membrane YM10) jusqu'à obtenir un volume d'environ 1 mL. Ensuite, une étape de chromatographie d'exclusion de taille automatisée est réalisée afin d'éliminer les contaminants résiduels, mais cela permet dans le même temps d'évaluer l'état d'oligomérisation de la protéine et d'éliminer d'éventuelles formes agrégées. La pureté des fractions contenant la protéine d'intérêt est analysée par migration sur gel polyacrylamide 15 % (v/v) en conditions dénaturantes et réductrices. Les fractions retenues sont concentrées et conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

## 2.6. Quantification des protéines

La quantité de protéine purifiée est estimée par mesure de l'absorption de l'échantillon à 280 nm et utilisation de la loi de Beer-Lambert. Le coefficient d'absorption molaire ( $\epsilon$ ) à 280 nm spécifique de chaque protéine est obtenu grâce au site ProtParam (Expasy) à partir de sa séquence primaire. Alternativement, lorsque l' $\epsilon_{280\text{nm}}$  d'une protéine est modifié par la présence d'un cofacteur, la concentration protéique est déterminée par un dosage colorimétrique (méthode BCA, Interchim). La méthode utilisée est basée sur la réduction d'ions  $\text{Cu}^{2+}$  en ions  $\text{Cu}^{1+}$  par les protéines en milieu alcalin, qui réagissent ensuite avec l'acide bicinchoninique (BCA) formant un complexe absorbant spécifiquement à 562 nm. La concentration massique obtenue après dosage de l'échantillon est

transformée en concentration molaire grâce au poids moléculaire spécifique de chaque protéine (ProtParam (Expasy)).

### 3. Purification d'anticorps à partir de sérum immun

#### 3.1. Fixation de l'antigène sur résine

La purification des anticorps est basée sur leur affinité avec les antigènes contre lesquels ils sont dirigés. La première étape consiste donc à fixer l'antigène sur une résine de Sepharose activée grâce à des groupements de bromure de cyanogène (CNBr). Les groupements CNBr permettent la fixation de l'antigène *via* la formation d'un pontage avec les groupements amines présents sur ce dernier.

Dans un premier temps, la résine CNBr Sépharose est traitée avec une solution d'acide chlorhydrique 1 mM (HCl), afin de préserver ses groupements réactifs, pouvant s'hydrolyser à pH trop alcalin. Elle est ensuite équilibrée dans du tampon 50 mM de bicarbonate de sodium (NaHCO<sub>3</sub>) et 5 mg d'antigène, préalablement dialysé contre du tampon 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> ; 0,5 M NaCl pH 8,3, sont incubés avec la résine dans un bécher sous agitation pendant 3 h à 4°C puis pendant 30 min à température ambiante. La résine est alors lavée avec 60 mL de tampon 50 mM NaHCO<sub>3</sub>, avant que les groupements réactifs résiduels soient bloqués avec 50 mL de tampon 1 M Tris-HCl pH 8,0 à 4°C. La résine est à nouveau équilibrée dans du tampon 50 mM NaHCO<sub>3</sub> puis dans du tampon TE.

#### 3.2. Purification d'anticorps par affinité à l'antigène

Le sérum immun contenant les anticorps dirigés contre l'antigène fixé sur la résine est déposé sur la colonne. La fraction non retenue est redéposée sur la colonne, et ce cycle est poursuivi pendant 3 h à 4°C afin de saturer les antigènes en anticorps. Une fois l'incubation terminée, le sérum immun est récupéré et stocké à -20°C, puis la liaison antigène-anticorps est déstabilisée grâce à une solution d'acide acétique 50 mM. Les anticorps ainsi élués sont dialysés contre du tampon TE, et leur pureté est analysée par migration sur gel polyacrylamide 15 % (v/v) en conditions dénaturantes et réductrices.

### 4. Méthodes électrophorétiques

#### 4.1. Electrophorèse sur gel d'agarose

Une électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer les molécules d'ADN présentes dans un échantillon en fonction de leur poids moléculaire. Cette méthode est rendue possible grâce à l'homogénéisation de la charge des molécules d'ADN par le tampon de charge. L'application d'un courant électrique au travers du gel d'agarose permet la migration des molécules d'ADN vers la cathode. La vitesse de migration dépend de la taille de la molécule d'ADN, du pourcentage d'agarose du gel (densité de la maille d'agarose) et de la puissance du courant électrique appliqué.

#### 4.1.a. Préparation de gels d'agarose

Lors de cette étude, la migration de l'ADN est généralement réalisée sur un gel d'agarose 1 % (m/v) permettant une migration optimale des molécules ayant une taille allant de 0,5 à 10 kb. La concentration d'agarose peut toutefois être modulée en fonction de la taille des molécules d'ADN présentes dans l'échantillon à analyser. Une concentration plus élevée en agarose permet une séparation plus résolutive des molécules d'ADN de petite taille. L'agarose est dissous dans du tampon TAE composé de 40 mM de Tris-HCl pH 8,0 ; 0,11 % (v/v) d'acide acétique et 1 mM EDTA chauffé jusqu'à ébullition. La solution est conservée à 60°C jusqu'à utilisation. Le gel est ensuite coulé et 0,0025 % (v/v) de bromure d'éthidium (BET), agent intercalant de l'ADN fluorescent par exposition à la lumière UV, est ajouté. La polymérisation du gel est réalisée par refroidissement jusqu'à température ambiante.

#### 4.1.b. Migration d'ADN sur gel d'agarose

Une fois le gel polymérisé, celui-ci est déposé dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE. Les échantillons d'ADN contenant du tampon de charge coloré (1 X) sont alors déposés et la migration est effectuée à 100 V. Lorsque le front de migration atteint l'extrémité du gel, la migration est stoppée et les molécules d'ADN présentes sont visualisées à l'aide d'un Trans-illuminateur UV (E-box, Vilber). La taille de chaque bande d'ADN est estimée à l'aide d'un marqueur de taille (ThermoFischer).

### 4.2. Electrophorèse sur gel polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices

Une électrophorèse sur gel polyacrylamide permet la séparation de protéines en fonction de leur poids moléculaire. De la même manière que pour l'électrophorèse de molécules d'ADN, la charge des protéines est homogénéisée grâce à un tampon de charge. Cependant dans le cas de protéines, leur structure tertiaire et quaternaire pouvant influencer leur migration, elles sont également dénaturées. Pour cela, du dodécylsulfate de sodium (SDS) est présent à la fois dans la composition du tampon de charge et du gel d'acrylamide. Ce détergent supprime les liaisons non-covalentes et se lie aux protéines, leur conférant ainsi une charge négative proportionnelle à leur taille et induisant leur linéarisation. Enfin, les protéines peuvent comporter des ponts disulfures entraînant un repliement spécifique. Un réducteur, le  $\beta$ -mercaptoéthanol ( $\beta$ MSH), peut être ajouté au tampon de charge afin de rompre ces liaisons covalentes si cela est souhaité.

#### 4.2.a. Préparation de gels polyacrylamide

Le gel polyacrylamide est formé d'un gel de concentration comportant une faible concentration en polyacrylamide (5,4 % (v/v)) et un pH de 6,8. Cet environnement permet aux protéines de migrer indépendamment de leur poids moléculaire grâce à un faible gradient électrique créé entre le glycérol (charge neutre à pH 6,8) et les ions  $\text{Cl}^-$  présents dans le tampon de charge. Les protéines commencent

donc leur migration simultanément dans le second gel appelé gel de séparation. Dans le gel de séparation, le pH de 8,8 induit une dissociation des molécules de glycérol permettant ainsi une séparation des protéines en fonction de leur taille. Lors de cette étude, la proportion d'acrylamide contenue dans le gel de séparation est comprise entre 10 et 17 % (v/v). Celle-ci est modulée en fonction du poids moléculaire des protéines contenues dans l'échantillon analysé ainsi que du niveau de résolution souhaité. L'augmentation de la proportion d'acrylamide dans le gel permet une séparation plus fine des protéines de faible poids moléculaire. La polymérisation de l'acrylamide est permise grâce à la présence de deux composés, le N,N,N',N'-Tétraméthyléthylènediamine (TEMED) et le persulfate d'ammonium (APS).

#### 4.2.b. Migration des protéines dans un gel polyacrylamide

Le gel polyacrylamide est déposé dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon de migration composé de 0,25 M Tris, 1,85 M glycine, 1 % (m/v) SDS. Les échantillons protéiques contenant du tampon de charge Laemmli (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 à 4°C, 2 % (m/v) SDS, 10 % (v/v) glycérol, 5 % (v/v)  $\beta$ MSH, 2% (m/v) bleu de bromophénol) sont déposés sur gel et la migration est effectuée à 180 V jusqu'à ce que le front de migration atteigne l'extrémité du gel. Le gel de concentration est alors éliminé puis le gel de séparation est coloré ou préparé pour être transféré sur une membrane de nitrocellulose afin de réaliser un Western-blot.

#### 4.2.c. Coloration au bleu de Coomassie

La coloration au bleu de Coomassie est celle communément utilisée au laboratoire. Elle repose sur la capacité du colorant à se fixer aux acides aminés basiques des protéines (arginine, histidine, lysine et tyrosine) par interactions électrostatiques mais également aux résidus aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) par interactions hydrophobes. Cette méthode permet la détection de bandes contenant jusqu'à un minimum de 300 ng de protéine.

Le gel de polyacrylamide est incubé environ 10 min dans une solution de coloration contenant 0,1% (m/v) de Coomassie R-250, 40 % (v/v) d'éthanol et 10 % (v/v) d'acide acétique. Le gel est ensuite rincé dans de l'eau afin d'éliminer le colorant excédentaire puis décoloré dans une solution contenant 7,5 % (v/v) d'éthanol et 5 % (v/v) d'acide acétique.

#### 4.2.d. Coloration au nitrate d'argent

La coloration au nitrate d'argent a été utilisée pour analyser le profil protéique d'échantillons peu concentrés, notamment à la suite d'expériences de co-immunoprécipitation (cf section 7). En effet, la limite de détection de cette technique est d'environ 0,1 ng/bande *ie.*, environ 3000 fois plus sensible que la coloration au bleu de Coomassie.

Afin d'éviter la diffusion des protéines dans le gel, celui-ci est incubé dans une solution de fixation contenant 30 % (v/v) d'éthanol et 5 % (v/v) d'acide acétique sur la nuit. Le lendemain l'acide

acétique et l'éthanol sont progressivement éliminés par incubation de 10 min dans des bains successifs d'éthanol 20 % (v/v), 10 % (v/v) puis dans de l'eau ultra pure. Une étape de sensibilisation est ensuite effectuée en incubant le gel dans une solution contenant 0,02 % (m/v) de thiosulfate de sodium afin d'améliorer la réactivité des protéines au nitrate d'argent. Le gel est ensuite rincé 5 fois successivement dans des bains d'eau ultra pure puis est incubé dans une solution de nitrate d'argent 0,212 % (m/v) pendant 30 min. Un bref lavage de 15 sec dans de l'eau ultra pure est effectué puis le développement du gel est initiée par incubation dans un bain de carbonate de sodium 3 % (m/v), thiosulfate de sodium 0,00125 % (m/v) et de formaldéhyde 0,03 % (v/v) jusqu'à apparition des bandes protéiques. La coloration est stoppée par incubation dans un bain d'acide acétique 5% (v/v) puis le gel est rincé dans de l'eau ultra pure.

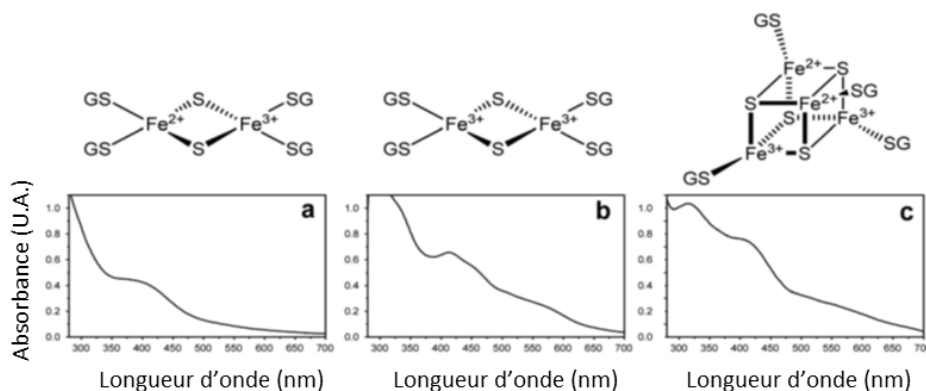
### 4.3. Western Blot

La détection de protéines *via* l'utilisation d'anticorps a été principalement utilisée lors de cette étude afin de vérifier la présence de GRXS15 dans des extraits mitochondriaux purifiés (cf section 6) utilisés par la suite dans les expérimentations de co-immunoprécipitation (cf section 7).

Après migration des échantillons protéiques sur gel de polyacrylamide 15 % (v/v), les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose afin de les rendre accessibles aux anticorps. Pour ce faire, le gel est directement mis au contact d'une membrane de nitrocellulose, du papier Whatman est placé de part et d'autre du montage puis le montage est entouré de mousse. Chaque composant est préalablement imbibé dans du tampon de transfert comprenant 0,3 % Tris, 1,4 % glycine, 10 % méthanol. Le montage est ensuite placé dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon de transfert et un courant électrique de 100 V est appliqué pendant 30 min. La membrane de nitrocellulose est ensuite incubée sur la nuit dans la solution commerciale « Intercept blocking buffer » (LiCor) diluée 2 fois avec du tampon PBS contenant 0,02 % (m/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,14 % (m/v)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,02 % (m/v) KCl et 0,8 % (m/v) NaCl. Cette étape permet de saturer la membrane en protéines limitant ainsi des interactions aspécifiques avec les anticorps et le bruit de fond associé. L'anticorps spécifique de la protéine ciblée est ajouté à une concentration de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et l'incubation est poursuivie pendant 30 min supplémentaires. Les anticorps primaires sont ensuite éliminés en effectuant 5 bains successifs de 10 min dans du tampon PBS supplémenté avec 0,05 % (v/v) Tween<sub>20</sub>. La membrane de nitrocellulose est ensuite incubée pendant 30 min dans la solution commerciale « Intercept blocking buffer » (LiCor) diluée 2 fois dans du tampon PBS contenant 0,01 % (m/v) SDS et 0,05 % (v/v) Tween<sub>20</sub> et l'anticorps secondaire (0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) couplé à un fluorochrome (LiCor). Celui-ci est ensuite éliminé en effectuant 3 bains successifs de 10 min dans du tampon PBS incluant 0,05 % Tween<sub>20</sub> puis 3 bains successifs de 10 min dans du tampon PBS. Enfin, la révélation du signal fluorescent spécifique émis par le fluorochrome attaché à l'anticorps secondaire est effectuée à l'aide du scanner Odyssey (Li-Cor; Bioscience)

## 5. Caractérisation de protéines Fe-S

La caractérisation d'une protéine à centre Fe-S comprend l'analyse de différents paramètres. Le premier consiste en l'identification du type de centre Fe-S (*ie* [2Fe-2S], [3Fe-4S] ou [4Fe-4S]) lié à la protéine. Un premier indice concernant la nature d'un centre Fe-S est son spectre d'absorption UV-visible. En effet des bandes d'absorption spécifiques sont discernables en fonction du type de centre Fe-S analysé (figure 14).



**Figure 14. Spectre d'absorption UV-visible de centre Fe-S en fonction de leur nature**

Spectre d'absorption UV-visible d'un centre (a) [2Fe-2S]<sup>+</sup>, (b) [2Fe-2S]<sup>2+</sup> ou (c) [4Fe-4S]<sup>2+</sup> coordonnés par du glutathion. (Invernici *et al.*, 2022)

Une seconde analyse complémentaire et réalisable sans appareil spécifique de spectroscopie consiste en la quantification du fer et du soufre labile lié à l'holoprotéine. Les valeurs obtenues lors de cette analyse sont rapportées à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon et à l'état d'oligomérisation de l'holoprotéine. Afin d'obtenir cette information, l'état d'oligomérisation peut être analysé comme décrit précédemment par SEC (section 2.4.d.).

### 5.1. Reconstitution de centre Fe-S

La reconstitution chimique *in vitro* d'un centre Fe-S est réalisée en condition d'anaérobie dans une enceinte à atmosphère contrôlée (boîte à gants, Jacomex) au sein de laquelle le niveau d'oxygène est inférieur à 5 ppm. Dans un premier temps, l'apo-protéine est réduite pendant 1 h avec un excès 10 fois de TCEP puis l'agent réducteur est éliminé par dessalage de l'échantillon sur colonne Zeba spin (Thermo Scientific™ ; 7K MWCO ; 0,5 ml). 100 μM d'apo-protéines sont alors incubés dans du tampon TN<sub>100</sub>, contenant 30 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM NaCl, avec un excès de Fe<sup>3+</sup>-citrate (adapté en fonction de la nature du centre Fe-S et de l'état d'oligomérisation de l'holoprotéine). Dans le cas de la GRXS15, 2 mM de GSH sont également présents dans le mélange réactionnel afin de permettre la coordination du centre Fe-S. Après environ 2 min d'incubation, le soufre (Li<sub>2</sub>S) est ajouté en équimolarité par rapport à la concentration de fer utilisée. La cinétique d'assemblage est suivie par mesure du spectre d'absorption UV-visible entre 240 et 800 nm à intervalle de temps régulier jusqu'à

stabilisation du signal. Le mélange réactionnel est ensuite dessalé par passage sur colonne G-25 préalablement équilibrée dans du tampon TN<sub>100</sub>, puis l'échantillon est concentré par ultrafiltration en centricon (Amicon Ultra 0,5 mL ; Millipore). Le spectre d'absorption UV-visible final de l'holoprotéine est alors mesuré entre 240 et 800 nm.

## 5.2. Dosage de fer

La quantification du fer consiste en un dosage colorimétrique basé sur la formation d'un complexe Fe<sup>2+</sup>-bathophénantroline absorbant spécifiquement à une longueur d'onde de 535 nm. Le dosage est réalisé sur des échantillons protéiques dilués avec de l'eau dans un volume final de 130 µL. Les protéines sont alors précipitées par ajout de 90 µL d'acide perchlorique 70 % (v/v). Après 15 minutes d'incubation, les échantillons sont centrifugés (Eppendorf F-45-12-11 ; 12000 x g ; 1 min ; température ambiante) et 180 µL du surnageant sont prélevés. 144 µL de bathophénantroline disulfate (1,7 mg/mL) sont alors ajoutés, ainsi que 72 µL d'ascorbate de sodium (38 mg/mL) permettant la réduction du Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup> suivi par l'ajout de 152 µL d'acétate d'ammonium (477 mg/mL) saturant ainsi la solution et favorisant la formation du complexe. Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance à 535 nm spécifique du complexe bathophénantroline-Fe<sup>2+</sup> est mesurée. Afin de s'affranchir d'un bruit de fond potentiel inhérent à la méthode, l'absorbance à 680 nm de l'échantillon est retranchée à la valeur précédemment obtenue. La quantité de fer est alors estimée à l'aide d'une courbe étalon allant jusqu'à une quantité de 20 nmole de Fe<sup>2+</sup> réalisée à partir d'une solution mère de Sel de Mohr, dans des conditions expérimentales identiques à celles décrites pour les échantillons protéiques.

## 5.3. Dosage de soufre

La quantification du soufre consiste en un dosage colorimétrique basé sur la formation de bleu de méthylène résultant de la réaction entre le soufre labile présent en solution et deux molécules de N,N-diméthyl-p-phénylènediamide (DMPD) en présence d'ion Cl<sup>-</sup> à pH acide. Le bleu de méthylène absorbant spécifiquement à une longueur d'onde de 670 nm, il est alors possible d'estimer la quantité de soufre présente en solution grâce à une courbe étalon réalisée à partir d'une solution mère de Li<sub>2</sub>S et allant jusqu'à une quantité de 20 nmoles de soufre. Le dosage est réalisé sur des échantillons dilués avec de l'eau dans un volume final de 100 µL. Le milieu est acidifié par ajout de 300 µL d'acétate de zinc (10 mg/mL) permettant la libération du soufre labile lié à la protéine, puis 15 µL de soude (3 N) sont directement ajoutés afin de neutraliser la solution et limiter la perte de soufre en solution causée par la formation d'H<sub>2</sub>S. Après 10 min d'incubation, 50 µL de DMPD (4,18 mg/mL ; 60 % (v/v) HCl) ainsi que 50 µL de FeCl<sub>3</sub> (8,18 mg/mL ; 10 % (v/v) HCl) sont ajoutés successivement. En ce qui concerne les échantillons protéiques, l'incubation est réalisée à 4°C pendant 3 h tandis que les solutions de Li<sub>2</sub>S sont incubées 30 min à température ambiante. Les échantillons sont centrifugés (Eppendorf F-45-12-11 ; 12000 x g ; 5 min ; température ambiante) avant de mesurer l'absorbance du surnageant à 670 nm.

#### 5.4. Test de stabilité du centre Fe-S

La stabilité du complexe homodimérique de GRXS15 liant un centre [2Fe-2S] (ci-après dénommé holo-GRXS15) a été évaluée dans différentes conditions. Pour cela, le spectre d'absorption UV-visible de l'échantillon entre 240 et 800 nm est mesuré à intervalle de temps régulier puis le pourcentage de réduction de l'absorbance à 412 nm est calculé afin d'estimer la proportion de complexe dégradé. Ainsi la sensibilité du complexe à l'oxygène a été testée en incubant 15  $\mu$ M d'holo-GRXS15 dans du tampon TN<sub>100</sub> en condition aérobie en présence ou en absence de 2 mM de GSH. La stabilité d'holo-GRXS15 en présence de DTT à une concentration de 2 mM, en présence ou en absence de GSH à une concentration de 2 mM, a été testée en condition anaérobie. Enfin, la stabilité d'holo-GRXS15 en présence d'EDTA à une concentration de 0,1 ou 1 mM a été testée en présence ou en absence de 2 mM de DTT et en présence de GSH en condition anaérobie.

#### 5.5. Formation d'hétérodimères GRXS15-BOLA

Cette expérience, réalisée en condition anaérobie, nécessite dans un premier temps la reconstitution de GRXS15, la concentration d'holo-GRXS15 étant estimée par mesure de l'absorbance à 412 nm de l'échantillon ( $\epsilon_{412 \text{ nm}} = 11750 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Azam *et al.*, 2020a)). Le partenaire (BOLA1 ou BOLA4) est alors ajouté en équimolarité par rapport à la concentration d'holo-GRXS15 dans un volume final de 500  $\mu$ L de tampon TN<sub>100</sub>. Dans le cas de BOLA4, la protéine est préalablement réduite par incubation avec un excès 10 fois de TCEP dans du tampon TN<sub>100</sub> et le réducteur éliminé par dessalage sur une colonne Zeba spin (Thermo Scientific™; 7K MWCO; 0,5 ml). La formation de l'hétérocomplexe est suivie par mesure du spectre d'absorption UV-visible entre 240 et 800 nm à intervalle de temps régulier jusqu'à stabilisation du signal.

#### 5.6. Test de transfert de centre Fe-S

Lors des tests de transfert de centre Fe-S, l'utilisation de protéine(s) comportant une étiquette poly-histidine permet la séparation de la protéine acceptrice du reste des protéines utilisées lors du transfert. De manière générale, la protéine acceptrice ne comporte pas d'étiquette poly-histidine contrairement aux autres protéines utilisées pour le transfert. Lorsque le complexe donneur (*ie* holo-GRXS15 ou un hétérocomplexe GRXS15-BOLA) comporte un centre [2Fe-2S]<sup>2+</sup> et la protéine acceptrice lie un centre [4Fe-4S]<sup>2+</sup> une source d'électrons est nécessaire pour permettre le couplage de deux centres [2Fe-2S]<sup>2+</sup>. Par conséquent, plusieurs donneurs d'électrons potentiels ont été testés.

##### 5.6.a. Transfert et couplage de centre Fe-S grâce à un donneur d'électrons chimique

Cette expérience, réalisée en condition anaérobie, nécessite dans un premier temps la reconstitution du centre Fe-S du complexe donneur (*ie* holo-GRXS15 ou un hétérocomplexe GRXS15-BOLA). De la même manière que pour la formation des hétérocomplexes GRXS15-BOLA, la



concentration d'holo-GRXS15 est estimée *via* son absorbance à 412 nm. La protéine acceptrice (ainsi que BOLA4 lorsqu'elle est utilisée) est préalablement réduite par incubation avec un excès 10 fois de TCEP dans du tampon TN<sub>100</sub> et le réducteur éliminé à l'aide d'une colonne Zeba spin (Thermo Scientific™ ; 7K MWCO ; 0,5 ml). Le mélange réactionnel est réalisé dans un volume final de 500 µL de tampon TN<sub>100</sub> et comporte 30 µM d'holo-GRXS15, 15 µM de l'apoforme de NFU4/5 ainsi que 2 mM d'un donneur d'électrons (DTT, TCEP ou GSH). Alternativement, la présence de BOLA1/4 à une concentration de 30 µM a également été testée afin de déterminer si cela permettait une accélération du transfert. Après 3 h d'incubation, le mélange réactionnel est déposé sur une colonne d'affinité au nickel IMAC (Cytiva) préalablement équilibrée dans du tampon TNI<sub>10</sub>. Les protéines non étiquetées sont alors éliminées par rinçage de la colonne avec un volume de tampon TNI<sub>10</sub> correspondant à 5 fois le volume mort de la colonne (CV). Les protéines étiquetées sont quant à elles éluées avec 5 CV de tampon TNI<sub>250</sub>. Les fractions de lavages et d'élution sont alors concentrées et dialysées contre du tampon TN<sub>100</sub> par ultrafiltration en centricon (Amicon Ultra 0,5 mL ; Millipore). Le spectre d'absorption UV-visible final de chaque échantillon est alors mesuré entre 240 et 800 nm puis le fer et le soufre lié aux protéines présentes dans chaque fraction sont dosés afin d'évaluer l'efficacité des réactions de transfert de centre Fe-S.

#### 5.6.b. Transfert et couplage de centre Fe-S grâce à un système de transfert d'électrons mitochondrial

Afin d'améliorer l'efficacité de la réaction de couplage de centre Fe-S, l'utilisation d'un système de transfert d'électrons physiologique a été testée. La procédure décrite précédemment reste la même à la différence que 2 µM de AtmFDX2, 0,5 µM de AtmFDR et 200 µM de NADPH se substituent au DTT. Cette méthode a également été testée avec le système humain formé par les protéines HsmFDX2, HsmFDR et du NADPH. Ce dernier a en effet été montré comme spécifiquement impliqué dans l'apport d'électrons nécessaires à la synthèse des centres Fe-S mitochondriaux, et plus particulièrement dans le couplage réductif de centre [2Fe-2S] provenant de HsGLRX5 afin de former un centre [4Fe-4S] sur le complexe HsISCA1-HsISCA2 (Weiler *et al.*, 2020).

### 5.7. Titration Isotherme Calorimétrique (ITC)

La méthode ITC permet la détermination de différents paramètres régissant l'interaction entre deux molécules (constantes de liaison (KD), stœchiométrie (n), enthalpie ( $\Delta H$ ) et entropie ( $\Delta S$ )). Elle est basée sur la mesure de l'émission ou de l'absorption de chaleur induite lors de la formation de liaison(s) entre deux molécules. Cette méthode a été principalement utilisée pour déterminer la capacité des protéines GRXS15, BOLA1 et BOLA4 à lier le fer ( $Fe^{2+}$  ou  $Fe^{3+}$ ) mais également pour détecter des interactions potentielles entre elles et avec les protéines NFU4 et NFU5.

Afin de mesurer leur capacité à lier le fer, les protéines contenant des cystéines sont préalablement réduites pendant 1 h avec un excès 10 fois de TCEP puis l'agent réducteur est éliminé par dessalage de

l'échantillon sur colonne Zeba spin (Thermo Scientific™ ; 7K MWCO ; 0,5 ml). L'échantillon protéique (50 µM) contenu dans du tampon 30 mM Tris-HCl (pH 8,0 à 20°C) 100 mM NaCl est alors déposé au sein de la cellule calorimétrique. La solution de fer (500 µM) est alors injectée progressivement et les variations de températures sont enregistrées, puis transformées en énergie dégagée ou absorbée par unité de temps (µcal/sec). A noter que dans le cas de la titration de fer ferrique (Fe<sup>2+</sup>), la solution est préparée en anaérobie à 1 mM afin de diminuer le temps de la titration et ainsi d'éviter l'oxydation de la solution de fer.

Lors de la mesure des interactions, les protéines contenant des cystéines sont réduites de la même manière que précédemment. Lors de la mesure d'interaction entre une holoprotéine et une protéine partenaire potentielle, l'holoprotéine est obtenue par la méthode précédemment décrite en section 5.1. L'échantillon protéique (25 µM) contenu dans du tampon 30 mM Tris-HCl (pH 8,0 à 20°C) 100 mM NaCl est alors déposé au sein de la cellule calorimétrique. L'interactant (250 µM) est alors injecté progressivement et les variations de températures sont enregistrées, puis transformées en énergie dégagée ou absorbée par unité de temps (µcal/sec).

## 6. Isolement de mitochondries issues de feuilles et pontage *in cellulose*

L'isolement des mitochondries utilisées lors de mes travaux a été réalisée en suivant la méthode IMTACT (Boussardon *et al.*, 2020). Cette méthode est basée sur l'utilisation de plants d'*A. thaliana* modifiés génétiquement afin d'exprimer, sous le contrôle du promoteur UBQ10, une version modifiée de la protéine membranaire mitochondrial OM64 (*Outer membrane Mitochondrial protein 64*) fusionnée à une GFP (*Green Fluorescence Protein*) et à un peptide BLRP (*Biotin Ligase Recognition Peptide*) en position C-terminale. Ces plants transgéniques expriment également la biotine ligase d'*E. coli* BirA sous le contrôle du promoteur UBQ10 permettant ainsi la biotinylation de la protéine hybride précédemment décrite. Les mitochondries biotinyllées de ces plantes peuvent alors être purifiées par affinité grâce à l'utilisation de billes de streptavidine. Par rapport aux méthodes classiques d'enrichissement en mitochondries, cette méthode permet à la fois une amélioration de la pureté des échantillons mitochondriaux obtenus mais également d'obtenir des échantillons de mitochondries de tissus spécifiques *via* l'utilisation de différents promoteurs (mésophylle, cellules compagnes, ...).

### 6.1. Culture de plants d'*Arabidopsis thaliana*

Les graines sont stratifiées pendant 2 jours à 4°C à l'obscurité avant un semis sur terreau. Les plants sont repiqués après 1 à 2 semaines de culture dans une enceinte de culture (*CLF Plant climatic*) en condition de jours courts (8 h jour/16 h nuit) avec une intensité lumineuse de 150 µE, 70 % d'humidité et arrosés avec de l'eau du robinet.

## 6.2. Enrichissement de mitochondries

Pour l'extraction, 5 g de feuilles de plants âgés de 6 à 8 semaines sont découpés et directement placés dans un mortier contenant 5 mL de tampon d'extraction constitué de 60 mM HEPES pH 8,0 à 4°C, 10 mM d'EDTA, 10 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM de saccharose, 1 mM de glycine, 25 mM de  $\text{Na}_4\text{PO}_7$ , 50 mM d'ascorbate de sodium, 20 mM de cystéine, 1 % (m/v) de polyvinylpyrrolidone et 1 % (m/v) de SAB. A partir de cette étape, la suite du protocole est réalisée à 4°C, 5 mL de tampon d'extraction supplémentaires et 250 mg de sable de Fontainebleau sont ajoutés sur les feuilles qui sont alors broyées jusqu'à obtention d'un mélange homogène. Ce mélange est filtré au travers d'une membrane Miracloth ayant une porosité de 200  $\mu\text{m}$ . Le filtrat est alors centrifugé (Beckman Coulter JA 25.50 ; 5 min ; 2500 x g ; 4°C) afin d'éliminer les débris cellulaires qui seront présents dans le culot. Le surnageant est centrifugé une seconde fois (Beckman Coulter JA 25.50 ; 30 min ; 15000 x g ; 4°C) dans le but de culoter les organites intacts. Le surnageant contenant le contenu soluble des cellules et organites lysés lors du broyage est éliminé tandis que le culot contenant les organites intacts est resuspendu dans du tampon de lavage composé de 10 mM HEPES pH 7,5 à 4°C, 2 mM d'EDTA, 10 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et 300 mM de saccharose constituant ainsi l'échantillon enrichi en mitochondries utilisé pour la suite de la purification.

## 6.3. Purification des mitochondries grâce à des billes de streptavidine

Dans un premier temps, 3 lots de 50  $\mu\text{L}$  de billes de streptavidine magnétiques sont lavés 3 fois successivement par resuspension dans 500  $\mu\text{L}$  du tampon de lavage comme précédemment décrit. L'échantillon enrichi en mitochondries est incubé avec un premier lot de billes pendant 10 min sous homogénéisation réalisée grâce à un carrousel (18 rpm). Les billes sont séparées du surnageant à l'aide d'un portoir aimanté et le surnageant est transféré sur un second lot de billes. Le surnageant est par la suite transféré au 3<sup>ème</sup> lot de billes selon le même processus. Les billes de streptavidine saturées en mitochondries sont ensuite lavées avec des volumes décroissants (800  $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{L}$ , 300  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ ) de tampon de lavage. Après le dernier lavage les billes sont resuspendues dans 100  $\mu\text{L}$  de tampon de lavage et les 3 lots de billes sont regroupées. La quantité de protéines solubles est ensuite estimée par dosage BCA (comme décrit en section 2.6) après lyse des mitochondries par dilution 1:1 dans du tampon de lyse (50 mM d'HEPES pH 7,5 à 20°C, 2 mM d'EDTA, 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 10 % de glycérol, 0,1 % de Triton X-100) et élimination des billes de streptavidine.

## 6.4. Pontage de complexes protéiques *in cellulo*

Les réactions impliquant GRXS15 étant par nature transitoires (oxydoréduction, transfert de centre Fe-S), j'ai tenté de réaliser un pontage des complexes protéiques mitochondriaux après purification de ces derniers dans le but de figer les interactions entre les protéines et leurs partenaires potentiels. Pour cela, les mitochondries purifiées ont été incubées dans du tampon de lavage supplémenté avec 0,5 % de formaldéhyde pendant 15 min à température ambiante. Cette molécule est capable de diffuser à travers

les membranes mitochondriales et réagit principalement, dans les conditions utilisées, avec les groupements amines des résidus cystéine et lysine des protéines (Srinivasa *et al.*, 2015). Après incubation, 125 mM de glycine est ajouté à l'échantillon et l'incubation est poursuivie pendant 30 min à température ambiante. Les fonctions amines de la glycine vont réagir avec le formaldéhyde restant et ainsi empêcher toute réaction excessive pouvant impacter la solubilité des complexes protéiques et ainsi leur utilisation pour la suite de la manipulation.

## 7. Co-immunoprécipitation

### 7.1. Fixation des anticorps sur des billes de protéines A

Afin de fixer les anticorps sur des billes de protéines A, ces derniers sont dialysés contre du tampon de lavage contenant 140 mM de NaCl, 8 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 10 mM de KCl. 50 µL de billes de protéines A magnétisées sont lavées 3 fois successivement par resuspension dans 500 µL de tampon de lavage. L'anticorps est ensuite incubé avec les billes dans 200 µL de tampon de lavage pendant 1 h à température ambiante sous agitation lente. Les anticorps non fixés sont ensuite éliminés par 3 à 4 lavages successifs par resuspension dans 500 µL de tampon de lavage. Les billes sont ensuite incubées 30 min à température ambiante sous agitation lente dans une solution de pontage contenant 10 mM 2-éthanosulfonique (MES) pH 6,0 à 20°C et 4 mM d'1-éthyl-3-[3-diméthylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC) permettant de stabiliser la liaison entre les anticorps et les protéines A. Les billes sont lavées 3 fois successivement par resuspension dans 500 µL de tampon d'éluion contenant 50 mM de glycine à pH 2,8, les fonctions amines de la glycine vont réagir avec le reste des groupements libres de l'EDC. Les billes sont finalement lavées 3 fois successivement par resuspension dans 500 µL tampon de lavage et stockées à 4°C dans du tampon de lavage jusqu'à utilisation.

### 7.2. Immunoprécipitation de l'antigène

L'immunoprécipitation est réalisée à partir d'un échantillon de protéines solubles mitochondriales, traité ou non au formaldéhyde (*cf* Section 6). L'échantillon est tout d'abord dilué 1:1 dans du tampon de lavage puis les anticorps dirigés contre AtGRXS15 couplés aux billes de protéines A sont ajoutés à l'échantillon et le mélange est incubé pendant 2 h à température ambiante. Les billes sont alors séparées du surnageant à l'aide d'un portoir magnétique, le surnageant est conservé à -20°C. Les protéines retenues de manière aspécifique sont ensuite éliminées par resuspension des billes dans 500 µL de tampon de lavage et séparation de celles-ci du surnageant à l'aide du portoir magnétique. Cette étape est réalisée 3 fois successivement. Enfin, la liaison anticorps-antigène est rompue par resuspension des billes dans 190 µL de tampon d'éluion acide contenant 50 mM de glycine à pH 2,8 et séparation des billes du surnageant à l'aide du portoir magnétique. Cette étape est également répétée 3

fois et les éluats sont directement tamponnés avec 10  $\mu\text{L}$  de tampon 1 M Tris-KOH pH 9,5 à 20°C.  
Toutes les fractions récoltées sont conservées à -20°C jusqu'à analyse

---

# Résultats et discussion

---

### III. Résultats et discussion

#### Chapitre 1 : Interactions moléculaires de GRXS15 liant un centre Fe-S

La létalité des mutants d'*Arabidopsis thaliana* pour *GRXS15*, mais aussi pour *NFU4/NFU5* semble directement liée à un défaut d'activité de la lipoate synthase mitochondriale (mLIP1), une protéine liant deux centres [4Fe-4S] (Moseler *et al.*, 2021; Przybyla-Toscano *et al.*, 2022). De même, l'activité des protéines dépendantes du cofacteur lipoate est affectée chez des mutants de levure pour *nfu1* et *bol1/3* et chez des patients comportant des mutations au sein du gène *BOLA3* (Baker *et al.*, 2014; Cameron *et al.*, 2011; Haack *et al.*, 2013; Melber *et al.*, 2016; Navarro-Sastre *et al.*, 2011; Uzarska *et al.*, 2016). L'interaction observée entre les protéines NFU1 et LIAS humaines (Warui *et al.*, 2022) et le fait que la protéine NfuA d'*E. coli* permette la réparation du centre [4Fe-4S] auxiliaire de la lipoate synthase (McCarthy *et al.*, 2019; McCarthy et Booker, 2017) suggèrent que les protéines NFU sont les donneurs directs de centre Fe-S, au moins pour le centre Fe-S qui est détruit après chaque réaction catalytique. Dans ce contexte, je me suis posé la question de la fonction biochimique des BOLA car les seules évidences au démarrage de cette thèse étaient la capacité à lier des centres [2Fe-2S] au sein d'hétérodimères avec les GRX (Dlouhy *et al.*, 2016; H. Li *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2009, 2012; Nasta *et al.*, 2017; Yeung *et al.*, 2011) ce qui posait question par rapport au fait que les études génétiques indiquaient des défauts de maturation des protéines liant des centres [4Fe-4S] chez les mutants pour le gène *BOLA* (Baker *et al.*, 2014; Cameron *et al.*, 2011; Haack *et al.*, 2013; Melber *et al.*, 2016; Uzarska *et al.*, 2016). Chez les plantes, il n'y a pas eu à ce jour d'études réalisées avec des mutants pour les gènes *BOLA1* ou *BOLA4* et donc il n'est pas clair s'il existe une contribution des protéines BOLA pour la maturation de la lipoate synthase et plus largement des protéines [4Fe-4S].

Au démarrage de ce projet de thèse, l'interaction binaire des protéines de GRXS15 avec les protéines BOLA avait été démontrée par la méthode de double hybride en levure et par complémentation de fluorescence *in planta* (Couturier *et al.*, 2014), aucune interaction n'avait été détectée entre GRXS15 et NFU4/5 et l'interaction entre BOLA1/4 et NFU4/5 n'avait pas été testée (Przybyla-Toscano, 2017). Les objectifs de cet axe de recherche étaient donc (i) d'obtenir GRXS15 sous sa forme liant un centre [2Fe-2S], ci-après dénommée holo-GRXS15, (ii) de caractériser l'interaction entre GRXS15 et les protéines BOLA1 et BOLA4 et (iii) de déterminer si BOLA1/4 sont capables d'interagir avec les protéines NFU4/5, ceci afin de valider un modèle dans lequel les protéines BOLA participent à une voie spécifique de transfert de centres [4Fe-4S] allant de GRXS15 vers les protéines NFU.

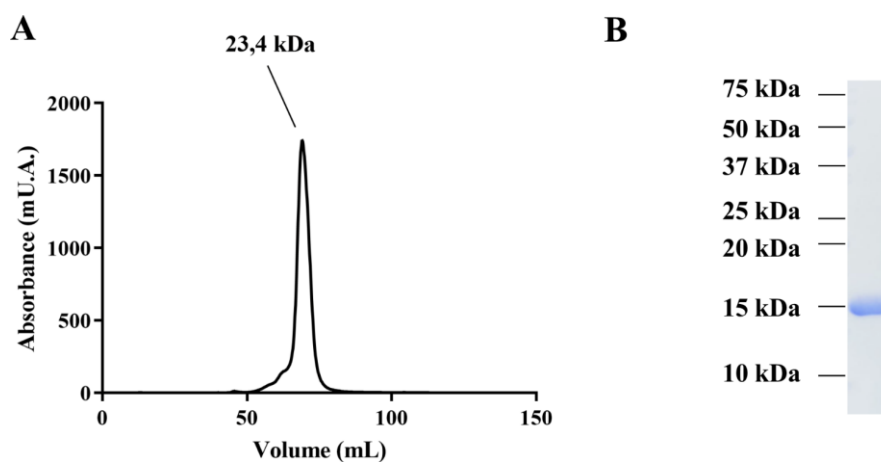
##### 1. Purification de GRXS15 monomérique

Au commencement du projet, les rendements obtenus à la suite des purifications de GRXS15 par le protocole classiquement utilisé au laboratoire n'étaient pas satisfaisants (2 à 3 mg/L de culture). L'utilisation du protocole de l'équipe du Pr Michael Johnson n'a malheureusement pas permis une

amélioration significative du rendement de protéine purifiée. Un temps non négligeable a donc été investi afin d'optimiser chacune des étapes de purification.

Au cours de la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium, le niveau d'hydratation de la protéine induit sa présence à la fois dans la fraction de protéines ayant précipitées entre 0 – 40% et 40 – 80% de saturation en sulfate d'ammonium. Des tentatives de purification ont été menées à partir des deux fractions. Il s'est avéré que la fraction 0 – 40% contenait majoritairement GRXS15 sous une forme agrégée au vu du profil d'élution de la protéine sur chromatographie d'exclusion de taille (ACA44). Afin de maximiser la quantité de protéine de départ, les protéines présentes dans une fraction 0 – 30% ont donc été éliminées et celles présentes dans la fraction 30 – 80 % ont été utilisées pour la suite de la purification.

D'autre part, j'ai observé lors de la purification de la version de GRXS15 comportant une étiquette histidine qu'une fraction des protéines purifiées liait un centre Fe-S stable en condition aérobie. Après analyse de l'échantillon par chromatographie d'exclusion de taille, il s'est avéré que cette fraction correspondait à des protéines agrégées. Afin d'homogénéiser l'état de la protéine au départ de la purification, l'échantillon a donc été traité avec du ferricyanure de potassium et de l'EDTA. Ce traitement a pour but de déstabiliser les centres Fe-S potentiellement liés à GRXS15 et par conséquent de favoriser la purification d'une fraction apo-monomérique, supposément plus stable que l'holo-forme. Ce traitement oxydant ayant potentiellement pour effet d'oxyder une partie des protéines, l'échantillon récolté après séparation sur chromatographie d'exclusion de taille (ACA44) a été traité avec du DTT avant l'étape de chromatographie échangeuse d'anion (Q-Sépharose). Enfin, une dernière étape de chromatographie d'exclusion de taille (S75 16/600) automatisée a été effectuée afin d'éliminer les quelques contaminants toujours présents et surtout de vérifier l'absence de formes agrégées.



**Figure 15. Chromatogramme d'exclusion de taille de GRXS15 monomérique**

(A) Chromatogramme d'exclusion de taille (S75 16/600) final de purification de GRXS15 non étiquetée et (B) profil protéique analysé par SDS-PAGE 15% suite à la concentration des fractions obtenues.



La séparation de l'échantillon obtenu sur chromatographie d'exclusion de taille automatisée permet également une estimation de la masse moléculaire de la protéine vis-à-vis de son volume d'élution par comparaison à celui de protéines globulaires de masses moléculaires connues. Dans le cas de GRXS15, un volume apparent supérieur d'environ 8 kDa à la masse moléculaire théorique est observé (23,4 vs 15,2 kDa). Cette variation est vraisemblablement due à la présence de l'extension N-terminale qui ne doit pas être structurée si on se base sur les analyses structurales réalisées avec la 1-C-Grx1 de *Trypanosoma brucei* (Manta *et al.*, 2013; Sturlese *et al.*, 2018).

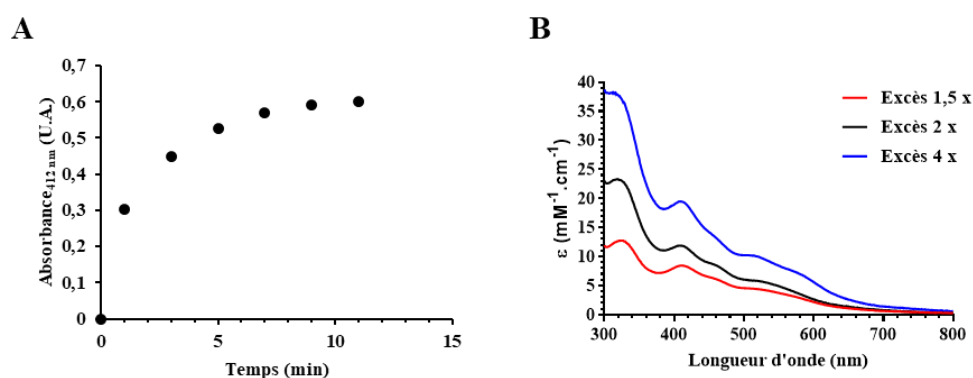
En résumé, l'optimisation du protocole de purification a permis une amélioration substantielle du rendement de protéine purifiée (6 à 10 mg/L de culture) ainsi que l'obtention d'un échantillon protéique pur et homogène au regard des analyses effectuées (figure 15).

## 2. Reconstitution chimique de GRXS15

Afin de pouvoir étudier la capacité de GRXS15 à interagir avec d'autres membres de la machinerie ISC, une étape cruciale a été l'optimisation d'un protocole permettant l'obtention d'holo-GRXS15. En effet, la protéine exprimée chez *E. coli* avec ou sans étiquette poly-histidine est essentiellement sous une forme ne liant pas de centre Fe-S, ci-après dénommée apo-GRXS15, que la purification soit réalisée en conditions aérobie ou anaérobie. De plus, les études faites jusqu'alors avaient été réalisées dans le laboratoire d'un collaborateur, le Pr Michael Johnson et il était nécessaire de mettre en place au laboratoire les protocoles de reconstitution *in vitro* de centres Fe-S.

Les expériences d'incorporation d'un centre Fe-S *in vitro* commençaient systématiquement par la réduction de la protéine en présence d'un excès 10-fois de TCEP. Par la suite, deux méthodes de reconstitution ont été testées afin d'obtenir une holo-GRXS15. La première, appelée reconstitution semi-enzymatique, consiste à incuber la protéine pré-réduite avec du sel de Mohr ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en présence de GSH, nécessaire à la fixation du fer. Après quelques minutes d'incubation, de la cystéine et la cystéine désulfurase IscS d'*E. coli* sont ajoutées dans le milieu réactionnel permettant un apport progressif d'ions sulfures ( $\text{S}^{2-}$ ) nécessaires à la formation du centre Fe-S. Cette méthode a précédemment été utilisée afin d'obtenir les échantillons d'holo-GRXS15 ayant permis de démontrer la capacité de la protéine à transférer son centre Fe-S à la FDX1 mitochondriale (Moseler *et al.*, 2015) et au complexe ISCA1a/2 (Azam *et al.*, 2020a). Cependant, les analyses réalisées au cours de ces études en présence d'un fort excès de fer et de cystéine ont montré la présence d'un mélange hétérogène contenant à la fois des complexes homodimériques de GRXS15 liant un centre [2Fe-2S] mais également un centre [3Fe-4S] linéaire. Ces deux entités peuvent en principe être séparées grâce à une résine échangeuse d'anions (Azam *et al.*, 2020a). Malheureusement, les essais réalisés au laboratoire ont systématiquement mené à l'obtention d'un échantillon contenant une majorité d'holo-GRXS15 agrégée d'après l'analyse de l'état d'oligomérisation. Cela m'a conduit à utiliser une seconde méthode appelée reconstitution chimique. La

première étape est similaire et consiste à incuber la protéine avec du citrate d'ammonium ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) et du GSH. Après quelques minutes, le soufre est ajouté sous la forme de lithium de soufre ( $\text{Li}_2\text{S}$ ) en équimolarité vis-à-vis de la concentration en fer précédemment utilisée. En considérant la stœchiométrie du complexe  $[\text{2Fe-2S}]:\text{GRXS15}_2:\text{GSH}_2$ , la protéine devrait en théorie fixer 1 atome de fer et 1 atome de soufre par monomère. Par conséquent, une incubation de la protéine avec différents excès de fer et de soufre (1,5-fois; 2-fois; 4-fois) a été testée. Dans chaque cas, la stabilisation du spectre d'absorption UV-visible de l'échantillon et donc la formation du centre Fe-S a été extrêmement rapide. En effet, 10 minutes sont par exemple suffisantes pour permettre une stabilisation du spectre d'absorption UV-visible dans la condition à 2 équivalents (figure 16A).



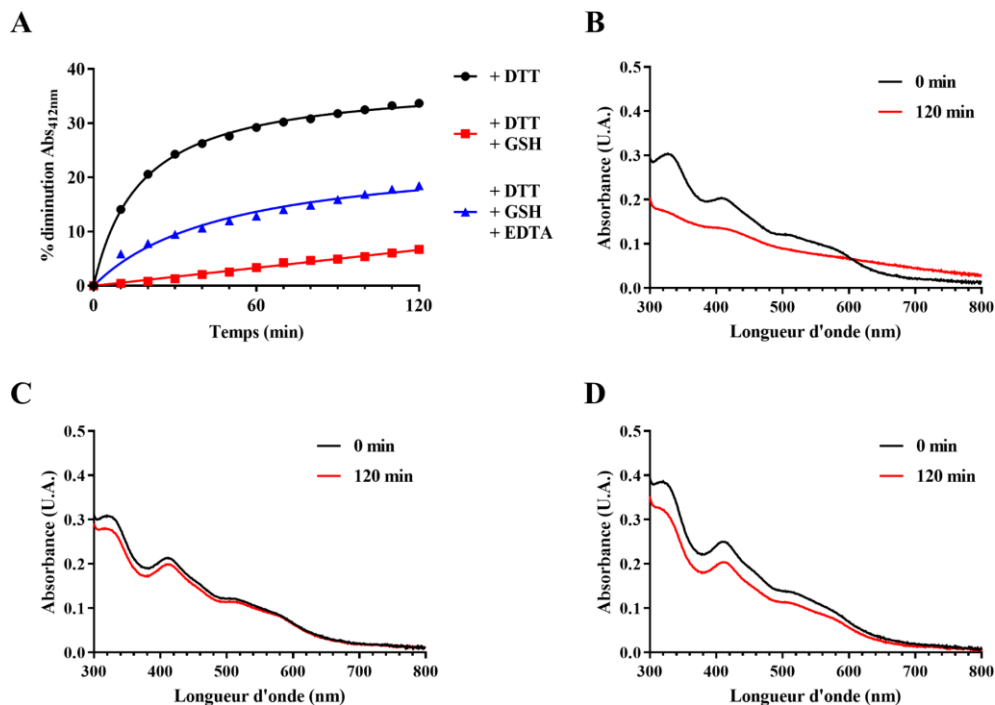
**Figure 16. Dynamique de reconstitution chimique et spectre d'absorption UV-visible d'holo-GRXS15**

(A) L'absorbance à 412 nm ( $[\text{GRXS15}] = 100 \mu\text{M}$ ;  $\epsilon_{412\text{nm}}(\text{holo-GRXS15}) = 11750 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) du mélange réactionnel de reconstitution chimique réalisé avec un excès de 2-fois en fer et en soufre a été mesurée à intervalle de temps régulier. (B) Le spectre d'absorption UV-visible d'holo-GRXS15 obtenu après reconstitution chimique avec un excès 1,5-fois (rouge), 2-fois (noir) et 4-fois (bleu) en fer et en soufre a été mesuré et les valeurs obtenues transformées en coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) en se basant sur la concentration en dimère de l'échantillon, déterminée par la méthode de dosage protéique BCA.

Après élimination du fer et du soufre non fixés, le spectre d'absorption UV-visible de chaque échantillon a été mesuré et transformé en coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) du dimère en se référant à la concentration molaire de l'échantillon obtenue par dosage protéique. Les bandes d'absorption caractéristiques de la présence d'un centre  $[\text{2Fe-2S}]$  sont présentes pour chaque échantillon aux longueurs d'onde de 320 nm, 412 nm, 460 nm et 518 nm. Dans le cas du spectre d'absorption UV-visible obtenu après incubation de GRXS15 avec un excès 4-fois de fer et de soufre, on peut cependant observer une augmentation importante de l'intensité de la bande d'absorption présente à 518 nm ainsi que l'apparition d'une bande d'absorption supplémentaire à 570 nm (figure 16B). Ces signaux ont été attribués à la présence de centres  $[\text{3Fe-4S}]$  linéaires (Azam *et al.*, 2020a). Couplé à une augmentation générale des coefficients d'absorption molaire aux longueurs d'onde comprises entre 300 et 800 nm, et proportionnelle aux excès de fer et de soufre utilisés lors de la reconstitution (figure 16B), ce résultat suggère que GRXS15 est capable de lier des quantités de fer et de soufre supérieures à celles nécessaires à l'assemblage d'un centre  $[\text{2Fe-2S}]$  selon les conditions utilisées. Il a donc été nécessaire d'adapter les

quantités de fer et de soufre apportées afin de favoriser la formation de centre [2Fe-2S], considéré comme la forme physiologique sur la base des évidences actuelles. Les dosages de fer réalisés sur ces échantillons confirment cette hypothèse. En effet après incubation avec des excès 1,5-fois, 2-fois et 4-fois les échantillons contiennent respectivement 0,78 Fe/dimère, 1,83 Fe/dimère et 2,60 Fe/dimère. Compte tenu de ce résultat, ainsi que de la similarité des coefficients d'extinction molaire de l'échantillon obtenus après incubation avec un excès 2-fois de fer et de soufre aux longueurs d'onde comprises entre 300 et 800 nm avec ceux rapportés précédemment (Azam *et al.*, 2020a), les reconstitutions *in vitro* d'holo-GRXS15 ont été réalisées dans ces conditions expérimentales.

Dans l'optique de réaliser des tests de transfert de centre Fe-S en utilisant l'holo-forme de GRXS15 comme donneur, la stabilité de l'holo-protéine en présence de différents agents a été testée. Pour cela, la diminution de l'absorbance spécifique du centre Fe-S à 412 nm a été mesurée à intervalle de temps régulier en condition anaérobie en présence de DTT qui pourrait remplacer un donneur d'électron physiologique tel que le système mFDXR/mFDX lors d'expériences en présence de NFU (figure 17).



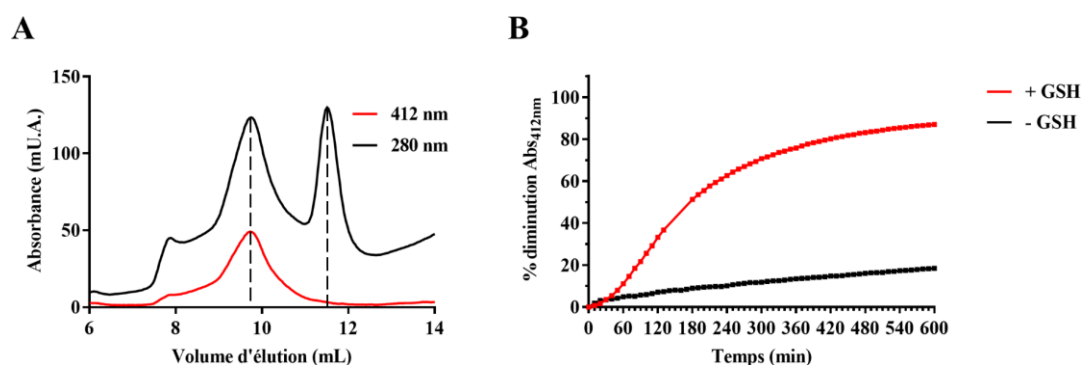
**Figure 17. Stabilité d'holo-GRXS15 en présence de DTT, GSH et EDTA**

(A) L'absorbance à 412 nm d'holo-GRXS15 a été mesurée à intervalle de temps régulier en présence de DTT (noir), de DTT et de GSH (rouge) ou de DTT, GSH et EDTA (bleu). Les valeurs obtenues sont transformées en % de diminution de l'absorbance à 412 nm en se référant à la valeur initiale. Les spectres d'absorption UV-visible d'holo-GRXS15 initiaux (noir) et après 120 min (rouge) en présence (B) de DTT, (C) de DTT et de GSH et (D) de DTT, GSH et EDTA ont été mesurés entre 300 et 800 nm.

Une diminution d'environ 30% de l'absorbance à 412 nm, spécifique de la présence du centre Fe-S, a été observée après 1 h en présence de 2 mM de DTT. Cette phase est suivie d'une stabilisation menant à une diminution totale d'environ 35 % après 2 h d'incubation (figure 17A). Cette diminution de l'absorbance à 412 nm de l'échantillon est accompagnée d'une modification générale du spectre

d'absorption UV-visible caractérisée par une diminution du rapport d'absorbance entre les longueurs d'ondes 320 et 412 nm ( $DO_{320\text{ nm}}/DO_{412\text{ nm}}$ ) passant de 1,5 à 1,3 et la quasi-disparition des bandes d'absorption habituellement associées au centre Fe-S (figure 17B). Ces effets ne sont pas observés lorsque 2 mM de GSH sont également ajoutés (figure 17A et 17C). Il serait donc envisageable que le DTT puisse remplacer une molécule de GSH au sein de la sphère de coordination du centre Fe-S en absence de GSH dans le milieu, tel que cela a été montré pour l'isoforme humaine HsGLRX5 (Sen *et al.*, 2018). La modification de la sphère de coordination du centre Fe-S serait à l'origine de la modification du spectre d'absorption. Une seconde hypothèse serait que la liaison du centre Fe-S par du DTT pourrait induire la réduction d'un ion ferrique présent au sein du centre  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  en ion ferreux. En effet, il a été montré que le spectre d'absorption UV-visible d'un centre  $[2\text{Fe-2S}]^+$  est drastiquement différent de celui d'un centre  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  (Invernici *et al.*, 2022). Une expérience similaire a été ensuite réalisée en présence de 2 mM de GSH, 2 mM de DTT et 100  $\mu\text{M}$  d'EDTA afin de visualiser une éventuelle dégradation du centre Fe-S. Malgré une diminution générale de l'intensité des bandes d'absorption spécifiques du centre  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ , due à la dégradation du centre Fe-S et la chélation des atomes de fer par l'EDTA, le rapport  $DO_{320\text{ nm}}/DO_{412\text{ nm}}$  reste environ égal à 1,5 (figure 17A et 17D). Ces résultats suggèrent que le DTT serait capable de se substituer à une molécule de GSH au sein de la sphère de coordination du centre Fe-S similairement à ce qui a été décrit lors de l'étude de GLRX5 (Sen *et al.*, 2018). Cette substitution pourrait alors avoir pour effet de modifier les caractéristiques d'absorption UV-visible du complexe. Des analyses complémentaires seraient nécessaires afin d'avoir une meilleure compréhension des effets sous-jacents non observables (état d'oxydation du centre Fe-S) avec les techniques disponibles au laboratoire.

Afin de vérifier l'état d'oligomérisation de l'échantillon d'holo-GRXS15 obtenu après reconstitution chimique, celui-ci a été soumis à une séparation par chromatographie d'exclusion de taille (figure 18A). Cette séparation se faisant en condition aérobie, 2 mM de GSH ont été ajoutés afin de stabiliser l'holo-forme avant la sortie de l'échantillon de la boîte à gants.



**Figure 18. Analyse de l'état d'oligomérisation et de la stabilité d'holo-GRXS15 en aérobie**

(A) Profil d'élution à 280 nm (noir) et 412 nm (rouge) d'holo-GRXS15 après séparation sur chromatographie d'exclusion de taille (S75 10/300) en aérobie. (B) L'absorbance à 412 nm d'holo-GRXS15 est mesurée à intervalle de temps régulier en absence (noir) ou en présence (rouge) de GSH en aérobie. Les valeurs obtenues sont transformées en % de diminution de l'absorbance à 412 nm en se référant à la valeur initiale.

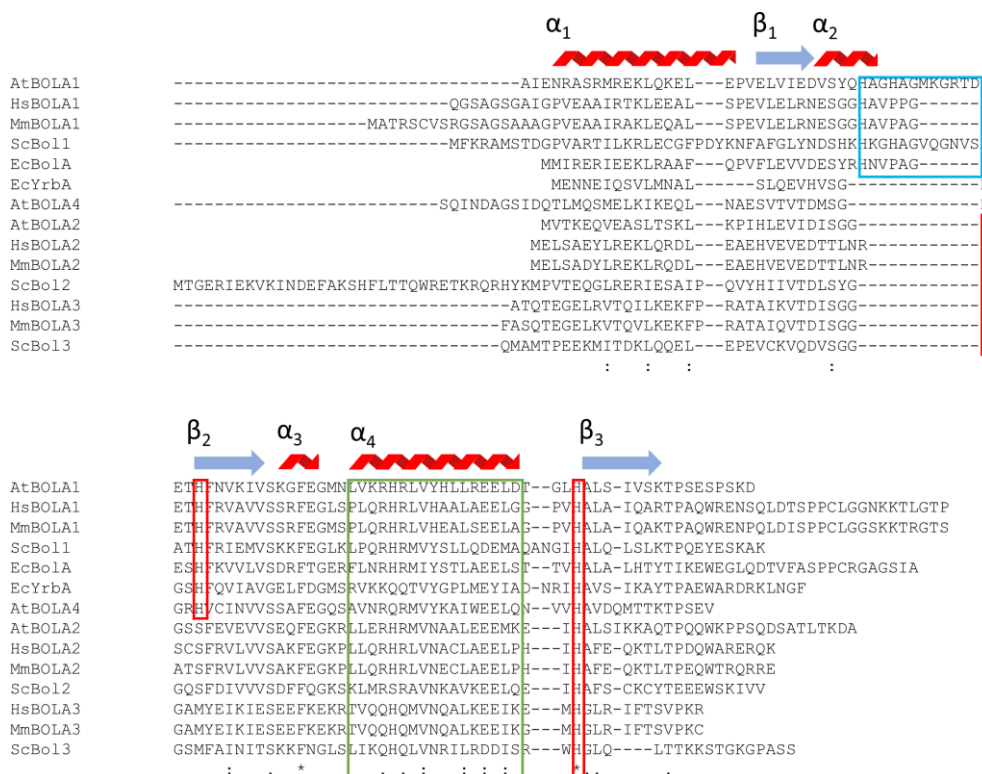
Le profil d'élution permet d'observer deux pics distincts élués à des volumes de 9,75 et 11,5 mL correspondant à des masses moléculaires apparentes de 49,6 et 26,7 kDa (figure 18A). D'après le suivi de l'absorbance à 412 nm, nous avons conclu que la forme liant un centre Fe-S, retrouvée dans le premier pic d'élution, était une forme dimérique de GRXS15 liant un centre [2Fe-2S] alors que la forme retrouvée dans le second pic d'élution correspondait à une forme apo-monomérique. Une si grande proportion d'apo-protéine était surprenante et nous l'avons attribuée à la dégradation du centre Fe-S en aérobie. D'ailleurs, nous avons observé que la présence de GSH a un effet délétère sur la coordination du centre Fe-S en condition aérobie sur le pas de temps nécessaire à la chromatographie (figure 18B). Cela pourrait être la conséquence de l'oxydation des molécules de GSH en GSSG, dont on sait qu'il induit la déstabilisation des centres Fe-S liés par les GRX (Lepka *et al.*, 2017). Cette expérience devrait être répétée en absence de GSH.

### 3. Analyse des hétérocomplexes formés avec les protéines BOLA1/4

La caractérisation biochimique des complexes GRX-BOLA n'a à ce jour pas été entreprise pour les isoformes mitochondriales présentes chez les plantes. Comme démontré par double hybride en levure, GRXS15 possède la capacité d'interagir avec les 3 isoformes BOLA présentes chez *A. thaliana* quel que soit leur localisation subcellulaire alors qu'une interaction avec BOLA4 a été confirmée par complémentation de fluorescence dans les mitochondries de protoplastes d'*A. thaliana* (Couturier *et al.*, 2014). Bien qu'aucun signal n'a été observé dans la mitochondrie pour des fusions traductionnelles BOLA1-GFP exprimées de manière stable dans des cellules épidermiques de tabac (Couturier *et al.*, 2014), des analyses protéomiques indiquent la présence de BOLA1 dans des protéomes mitochondriaux (Fuchs *et al.*, 2020; Niehaus *et al.*, 2020). Ainsi, BOLA1 et BOLA4 seraient toutes les deux adressées à la fois dans les chloroplastes et les mitochondries et nous avons décidé pour cette étude de tester leur interaction avec GRXS15. Des études réalisées sur les homologues mitochondriaux présents chez l'Homme ont mis en évidence des caractéristiques drastiquement différentes entre les complexes GLRX5-BOLA1 et GLRX5-BOLA3 (Nasta *et al.*, 2017). Sur la base de la stabilité du centre Fe-S vis-à-vis des conditions réductrices, il a été conclu que le premier complexe, plus stable, pourrait être impliqué dans des réactions de transfert d'électrons, alors que le second serait impliqué dans le transfert de centre Fe-S, d'autant que le centre [2Fe-2S] est plus labile. En effet, il a ainsi été montré que l'hétérodimère GLRX5-BOLA3 est capable de transférer son centre Fe-S à la protéine NFU1 afin de former un centre [4Fe-4S] sur cette dernière par couplage réductif de deux centres [2Fe-2S] en présence de DTT (Nasta *et al.*, 2017, 2020). L'objectif était donc de déterminer si ces spécificités existent pour les isoformes mitochondriales présentes chez *A. thaliana*, d'obtenir si possible des informations sur les processus de formation des hétérodimères GRXS15-BOLA1 et GRXS15-BOLA4, leurs propriétés respectives et leur éventuels rôles physiologiques, ou même la nature des ligands du centre Fe-S fournis par les protéines BOLA.

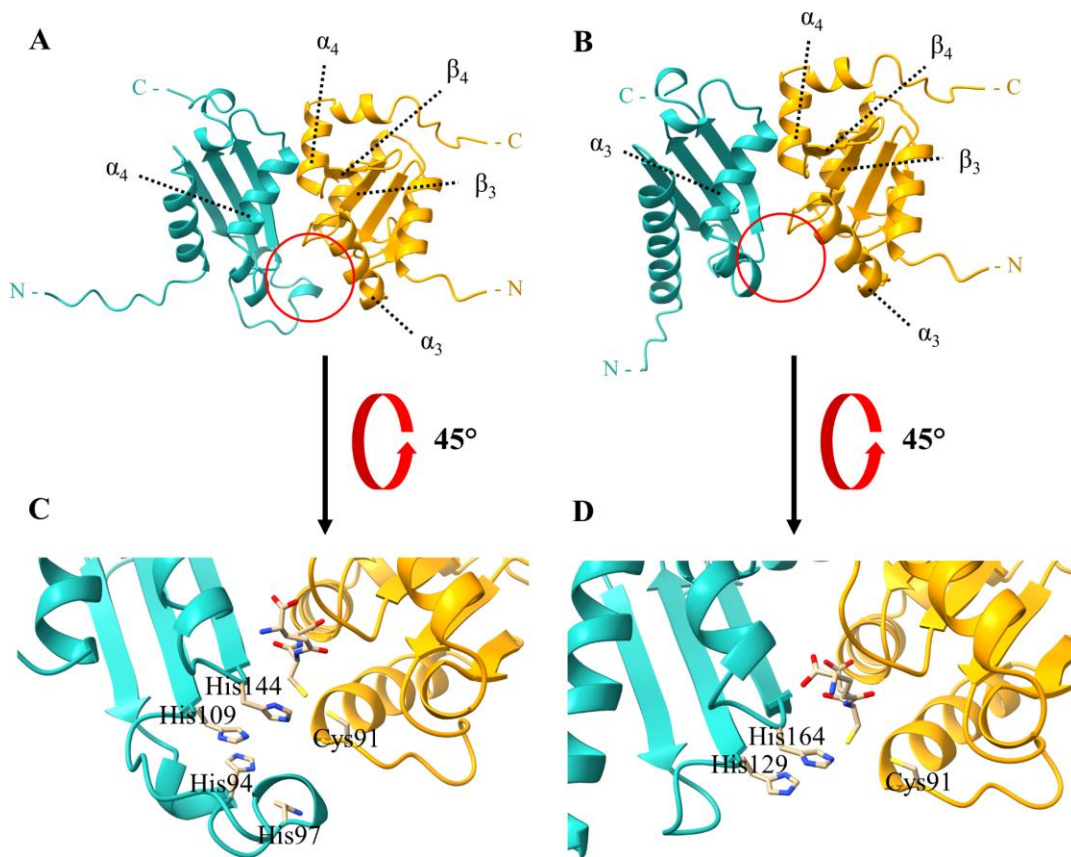
### 3.1. Analyses in silico

Des analyses structurales ont précédemment permis de résoudre les structures de l'isoforme BOLA2 cytosolique d'*A. thaliana*, de type BOLA à cystéine, mais aussi de la protéine BOLA1 et du domaine BOLA de SUFE1, de type BOLA à histidine (Roret *et al.*, 2014). Ces analyses ont aussi permis de mettre en évidence les régions d'interactions entre les GRX et les BOLA. Dans le but d'avoir un aperçu des caractéristiques structurales des complexes GRXS15-BOLA1/4 ainsi que des ligands du centre Fe-S apportés par les protéines BOLA, la prédiction de la structure tridimensionnelle d'hétérodimères a été obtenue grâce l'algorithme « AlphaFold2 Multimer » (Evans *et al.*, 2021). En ce qui concerne GRXS15, la protéine présente la structure canonique retrouvée chez les TRX composée de 4 brins  $\beta$  et 3 hélices  $\alpha$  organisés de la manière suivante :  $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ . Deux hélices  $\alpha$  supplémentaires sont cependant présentes, l'une à l'extrémité N-terminale et la seconde à l'extrémité C-terminale. Une extension N-terminale prédite comme étant non-structurée est également présente mais n'est pas représentée ici. La cystéine de GRXS15 servant de ligand est située au niveau de la boucle précédant la seconde hélice  $\alpha$ . Pour ce qui est des protéines BOLA, elles présentent une structure canonique composée de 3 hélices  $\alpha$  et 3 brins  $\beta$  avec une topologie de type  $\alpha\beta\beta\alpha\alpha\beta$  (Roret *et al.*, 2014). Une hélice  $\alpha$  supplémentaire peut néanmoins être présente entre les deux premiers brins  $\beta$ , ou à l'extrémité C-terminale de certaines isoformes.



**Figure 19. Alignement des séquences protéiques de représentants de la famille des protéines BOLA**  
 Les séquences matures (*ie* dépourvues des peptides transits) des protéines BOLA ont été alignées *via* « MUSCLE ». Les structures secondaires sont représentées sur la base de la structure d'AtBOLA1 (pdb : 4PUG (Roret *et al.*, 2014)). L'insertion spécifiquement retrouvée dans les protéines du sous-groupe BOLA1 est indiquée en bleu, les ligands potentiels du centre Fe-S en rouge et la région d'interaction avec les GRX en vert.

Une différence notable entre les deux types de BOLA (à cystéine ou à histidine) est la présence de 13 acides aminés supplémentaires entre les brins  $\beta_1$  et  $\beta_2$  de BOLA1 qui constitue une hélice supplémentaire ( $\alpha_2$ ; figure 19). Cette insertion est également présente dans d'autres protéines du groupe BOLA1 issues de divers organismes et dans Bol1 de *S. cerevisiae* (figure 19). Une histidine, strictement conservée au sein des protéines BOLA est présente entre l'hélice  $\alpha_4$  et le brin  $\beta_3$  (figure 19), constitue un ligand du centre Fe-S dans tous les cas. En revanche, le second ligand varie selon les isoformes BOLA. Il s'agit d'une histidine présente au niveau du brin  $\beta_2$  dans le cas d'AtBOLA1 et AtBOLA4 ou d'une cystéine dans le cas d'AtBOLA2. Notons l'existence d'une autre histidine conservée au niveau de l'insertion présente dans les isoformes BOLA1.



**Figure 20. Modèle de la structure 3D des hétérodimères (A-C) GRXS15-BOLA1 et (B-D) GRXS15-BOLA4** GRXS15 (résidus 60-169) et les protéines BOLA (BOLA1 : résidus 54-160 ; BOLA4 : résidus 89-177) sont respectivement représentées en orange et cyan. Les ligands potentiels (Cys91 pour GRXS15, His94, His97, His109 et His144 pour BOLA1, His129 et His164 pour BOLA4) sont représentés en beige. L'ajout d'une molécule de GSH a été réalisé *via* l'utilisation de l'algorithme « *Autodock Vina* », celle-ci est représentée ici en beige.

D'après les prédictions obtenues, les surfaces d'interaction directes entre les protéines des couples GRXS15-BOLA1 et GRXS15-BOLA4 sont similaires et impliqueraient des résidus situés entre l'hélice  $\alpha_3$  et le brin  $\beta_3$ , au niveau du brin  $\beta_4$  ainsi que de l'hélice  $\alpha_4$  au niveau de GRXS15 et des résidus présents au sein de l'hélice  $\alpha_4$  de BOLA1 et de l'hélice  $\alpha_3$  de BOLA4 (figure 20A et 20B). Ces zones d'interaction coïncident avec celles précédemment mises en évidence pour le couple GRXS14-BOLA2 (Roret *et al.*, 2014). La sphère de coordination du centre Fe-S est quant à elle située à l'interface entre

l'hélice  $\alpha_2$  de GRXS15 et des brins  $\beta_2$  et  $\beta_3$  des BOLA (figure 20C et 20D). D'après la prédiction, l'orientation de la cystéine catalytique de GRXS15 et des histidines des protéines BOLA serait favorable à la fixation d'un centre Fe-S. Il est intéressant de noter que l'insertion de 13 AA présente au sein de BOLA1 semble former une coiffe pouvant limiter l'exposition du site de fixation du centre Fe-S au solvant. Comme mentionné précédemment, cette boucle supplémentaire absente au sein de la séquence de BOLA4 contient deux histidines supplémentaires qui pourraient, d'après leur orientation prédite, également permettre la liaison au centre Fe-S. Ces caractéristiques spécifiques à BOLA1 pourraient permettre une stabilisation plus efficace du centre Fe-S dans le contexte de la formation d'un holo-hétérodimère impliquant cette protéine.

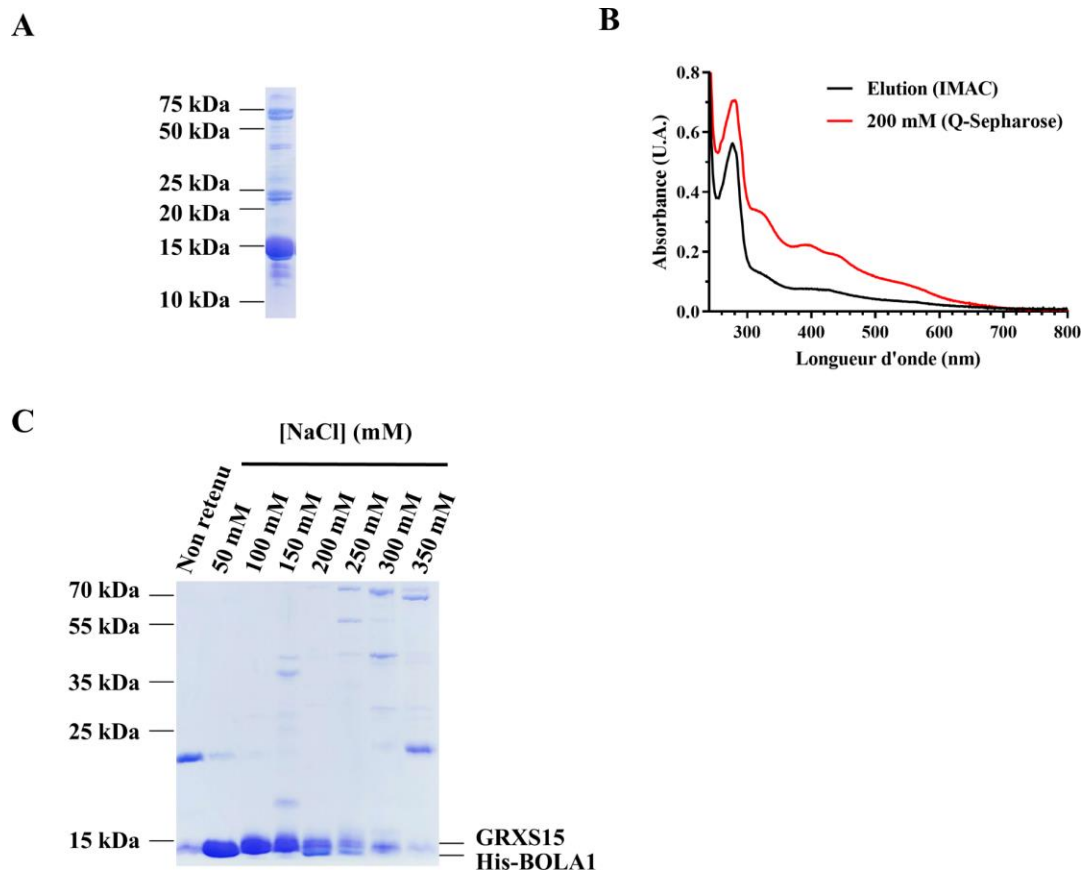
### 3.2. Co-expression des protéines GRXS15-BOLA et purification

Dans le but de caractériser les interactions entre GRXS15 et les protéines BOLA, celles-ci ont été co-exprimées afin d'induire la formation des hétérocomplexes GRXS15-BOLA1 et GRXS15-BOLA4 *in vivo*. Pour cela, les séquences codantes ont été insérées dans les deux sites de clonage du vecteur pCDF-Duet de manière à ce qu'une étiquette poly-histidine soit ajoutée aux protéines BOLA. Cette stratégie a été employée afin d'éviter la purification d'un mélange contenant aussi de l'holo-GRXS15, cette espèce étant supposément plus difficile à séparer des hétérocomplexes GRXS15-BOLA que des formes monomériques des BOLA.

#### 3.2.a. GRXS15-BOLA1

Après purification par chromatographie d'affinité métallique en condition anaérobie, les fractions collectées contiennent une grande majorité de BOLA1 (figure 21A). Cependant, le spectre d'absorption présente des bandes d'absorption dans la partie visible du spectre pouvant indiquer la présence d'un cofacteur (figure 21B).

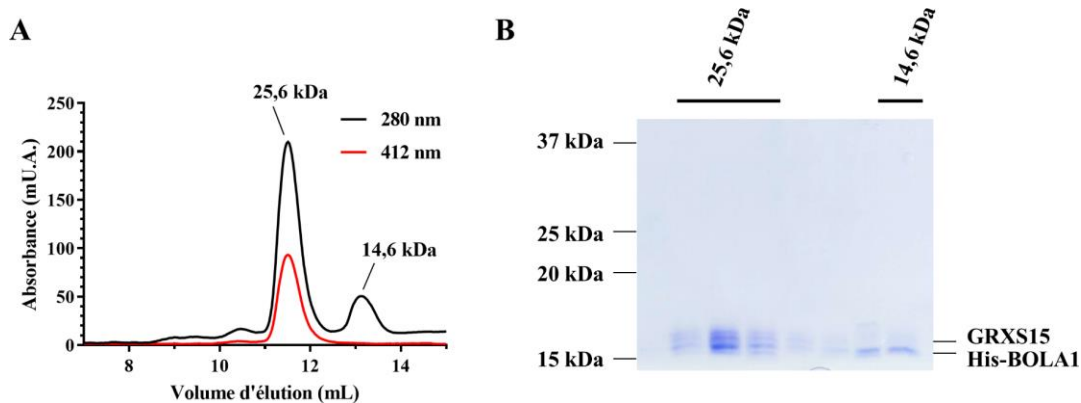




**Figure 21. Analyse de la co-purification de GRXS15 – His-BOLA1 en anaérobie**

(A) Profil protéique sur SDS-PAGE 15% après co-expression de GRXS15 et His-BOLA1 et purification par chromatographie d'affinité métallique (IMAC). (B) Spectre d'absorption UV-visible de l'échantillon après purification par IMAC (noir) et après chromatographie échangeuse d'anions (Q-Sépharose) (rouge, fraction éluée dans du tampon contenant 200 mM de NaCl). (C) Profil protéique sur SDS-PAGE 15% après chromatographie échangeuse d'anions (Q-Sépharose).

Une chromatographie échangeuse d'anions (Q-Sépharose) a ensuite été réalisée afin de séparer la forme monomérique de BOLA1 d'un potentiel hétérodimère GRXS15-BOLA1 liant un centre Fe-S. Des tampons ayant une concentration croissante en NaCl ont donc été appliqués afin d'éluer progressivement les protéines retenues. La forme monomérique de BOLA1 est ainsi éluee aux concentrations en NaCl les plus faibles (50 – 150 mM). Une espèce pouvant correspondre à GRXS15 est quant à elle éluee simultanément avec BOLA1 avec des tampons contenant 200 – 250 mM de NaCl (figure 21C). Les bandes d'absorption représentatives de la présence d'un centre Fe-S sont majoritairement associées à la fraction éluee à une concentration de 200 mM de NaCl (figure 21B). Cette fraction a donc été analysée par chromatographie d'exclusion de taille.



**Figure 22. Analyse de l'échantillon obtenu après co-purification de GRXS15 – His-BOLA1 par chromatographie d'exclusion de taille**

(A) Profil d'élution de chromatographie d'exclusion de taille (S75 10/300) réalisée en aérobic de la fraction éluee de la Q-Sépharose à 200 mM en NaCl. L'absorbance à 280 nm est représentée en noir, celle à 412 nm en rouge. (B) Profil protéique sur SDS-PAGE 15% des fractions obtenues après séparation sur chromatographie d'exclusion de taille (S75 10/300).

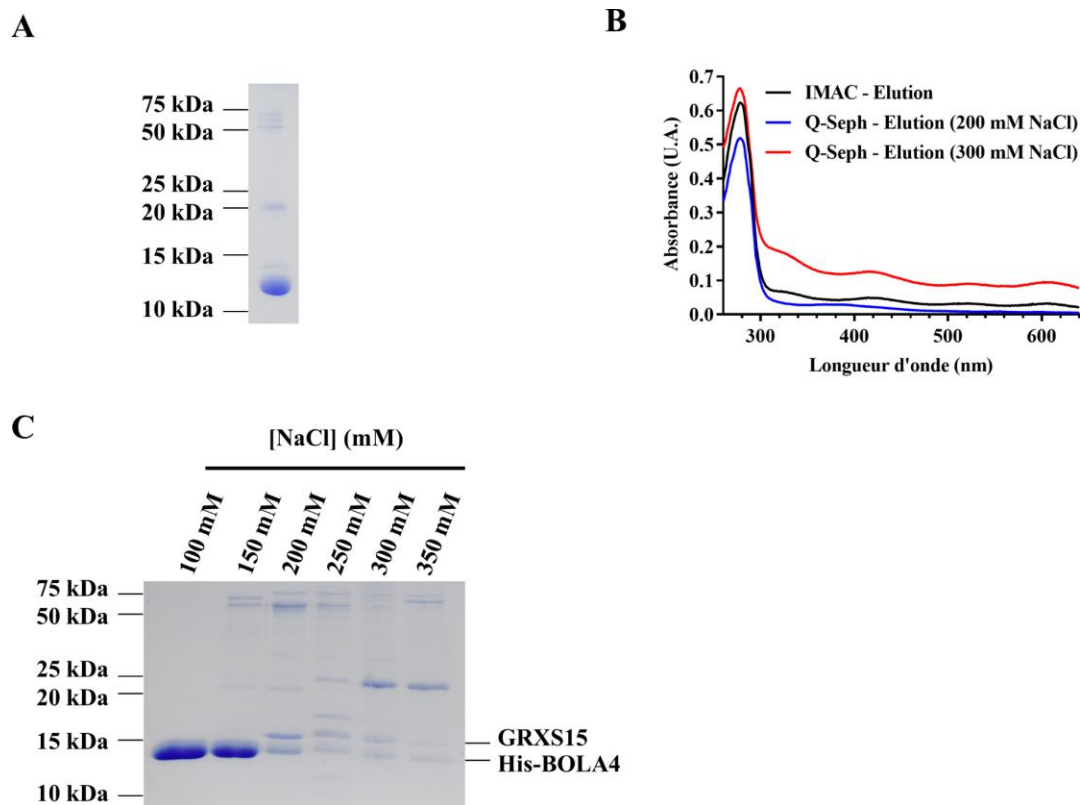
Deux espèces ont ainsi pu être séparées (figure 22A et 22B). BOLA1 se retrouve dans les deux pics distincts respectivement associés à une masse moléculaire estimée de 25,6 et 14,6 kDa. Le premier pic contient également une seconde protéine de masse moléculaire apparente sur gel plus importante et correspondant potentiellement à GRXS15. De plus, ce pic présente une absorption à 412 nm suggérant la liaison d'un centre Fe-S au sein de l'hétérocomplexe GRXS15-BOLA1. Le second correspond vraisemblablement à la protéine sous sa forme monomérique d'après la masse moléculaire théorique de la protéine de 14,4 kDa.

En conclusion, la méthode utilisée a permis de mettre en évidence que (i) l'expression simultanée de GRXS15 et BOLA1 en système hétérologue permet l'observation d'une interaction entre les deux protéines, (ii) cette interaction permet la liaison d'un centre Fe-S par le complexe protéique et (iii) ce complexe est suffisamment stable pour permettre son analyse par chromatographie d'exclusion de taille en condition aérobic. L'estimation de la masse moléculaire de l'hétérodimère potentiel reste cependant intrigante. En effet, une valeur similaire avait été obtenue lors de l'estimation de masse moléculaire de forme monomérique de GRXS15. Cette surestimation avait été attribuée à la présence de l'extension N-terminale de la protéine supposément non structurée. L'hypothèse privilégiée serait que l'interaction entre les deux protéines permette un repliement de cette extension induisant une diminution du volume apparent de la protéine et donc du biais préalablement observé.

### 3.2.b. GRXS15-BOLA4

La méthode utilisée lors de la purification de l'hétérocomplexe GRXS15-BOLA1 ayant apporté les résultats escomptés, la même procédure a été appliquée à l'échantillon protéique issu de la co-expression de GRXS15 et BOLA4. A nouveau, l'échantillon obtenu après chromatographie d'affinité métallique

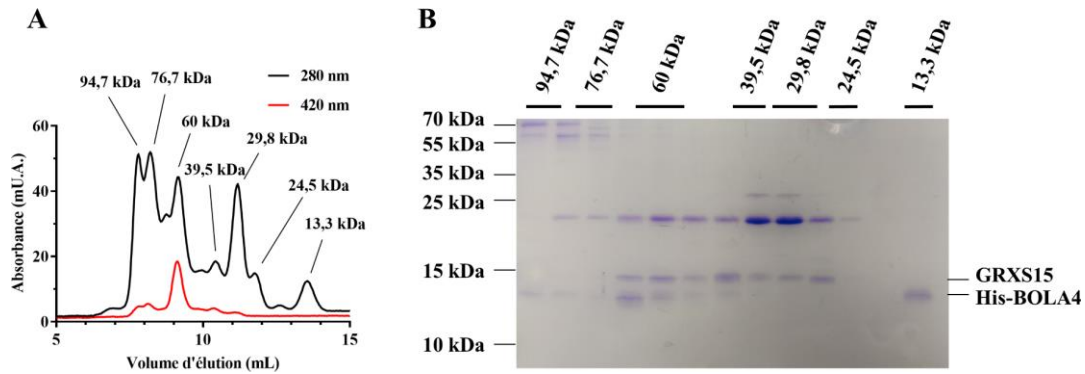
contient une majorité de BOLA4 et le spectre d'absorption UV-visible associé présente des bandes d'absorption suggérant la présence d'un cofacteur (figure 23A et 23B).



**Figure 23. Analyse de la co-purification de GRXS15 – His-BOLA4 en anaérobie**

(A) Profil protéique sur SDS-PAGE 15% après co-expression de GRXS15 et His-BOLA4 et purification par chromatographie d'affinité métallique (IMAC). (B) Spectre d'absorption UV-visible de l'échantillon après purification par IMAC (noir) et après chromatographie échangeuse d'anions (Q-Sépharose) (bleu, fraction éluée dans du tampon contenant 200 mM de NaCl ; rouge, fraction éluée dans du tampon contenant 300 mM de NaCl). (C) Profil protéique sur SDS-PAGE 15% après chromatographie échangeuse d'anions (Q-Sépharose).

A la suite de la chromatographie échangeuse d'anion (Q-Sépharose), la forme monomérique de BOLA4 est éluée aux concentrations en NaCl les plus faibles (100 – 150 mM), similairement à ce qui avait été observé dans le cas de BOLA1. Une espèce pouvant correspondre à GRXS15 est quant à elle éluée simultanément avec BOLA4 avec des tampons ayant des concentrations de 200 – 300 mM de NaCl, dans une stœchiométrie d'approximativement 1:1 sur la base du profil de migration de l'échantillon sur SDS-PAGE (figure 23C). Malgré que l'abondance relative de GRXS15 et BOLA4 soit plus importante dans la fraction éluée à 200 mM de NaCl, les bandes d'absorption représentatives de la présence d'un centre Fe-S sont majoritairement associées à celle éluée à une concentration de 300 mM de NaCl (figure 23B). Cette fraction a donc été analysée par chromatographie d'exclusion de taille, même si elle est contaminée par une protéine de masse d'environ 23 kDa.



**Figure 24. Analyse de l'échantillon obtenu après co-purification de GRXS15 – His-BOLA4 par chromatographie d'exclusion de taille**

(A) Profil d'élué de chromatographie d'exclusion de taille (S75 10/300) réalisée en aérobic de la fraction élue de la Q-Sépharose à 300 mM en NaCl. L'absorbance à 280 nm est représentée en noir, celle à 420 nm en rouge. (B) Profil protéique sur SDS-PAGE 15% des fractions obtenues après séparation sur chromatographie d'exclusion de taille (S75 10/300).

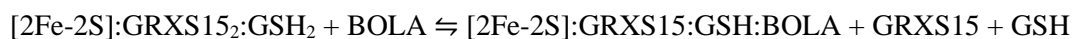
Un certain nombre d'espèces ont ainsi pu être séparées (figure 24A et 24B). La protéine contaminante se retrouve dans la plupart des pics d'absorbance observés sauf dans celui correspondant à une masse moléculaire estimée de 13,3 kDa, dans lequel on retrouve BOLA4, en cohérence avec la masse théorique de 11,5 kDa et les résultats obtenus lors de la purification de la protéine exprimée seule. GRXS15 se retrouve *a priori* dans 3 pics distincts associés à une masse moléculaire estimée de 29,8 ; 39,5 et 60 kDa. Dans la fraction de masse moléculaire estimée à 60 kDa, on retrouve également BOLA4 et une absorption à 420 nm, suggérant qu'elle contient un hétérocomplexe GRXS15-BOLA4 liant un centre Fe-S. Toutefois, la masse apparente de 60 kDa est bien supérieure à celle observée pour l'hétérocomplexe GRXS15-BOLA1 (25 kDa). Ceci pourrait suggérer la présence d'un hétérotétramère formé par 2 molécules de GRXS15 et deux molécules de BOLA4, ou à une interaction de l'hétérodimère GRXS15-BOLA4 avec la protéine contaminante ayant une masse moléculaire d'environ 23 kDa.

Globalement, cette approche n'a pas donné les résultats escomptés dans le cas de la co-purification de GRXS15 et BOLA4. Une première raison est liée au fait que BOLA4 est plus fortement exprimée que GRXS15. Une autre explication pourrait tenir au fait que le centre Fe-S est peu stable, comme le suggère les prédictions de structure indiquant que le centre Fe-S serait plus exposé au solvant, et donc potentiellement plus sensible à la présence d'oxygène. Ainsi, nous nous sommes focalisés par la suite sur la formation des complexes GRXS15-BOLA *in vitro*.

### 3.3. Formation d'holo-complexes GRXS15-BOLA1/4 *in vitro*

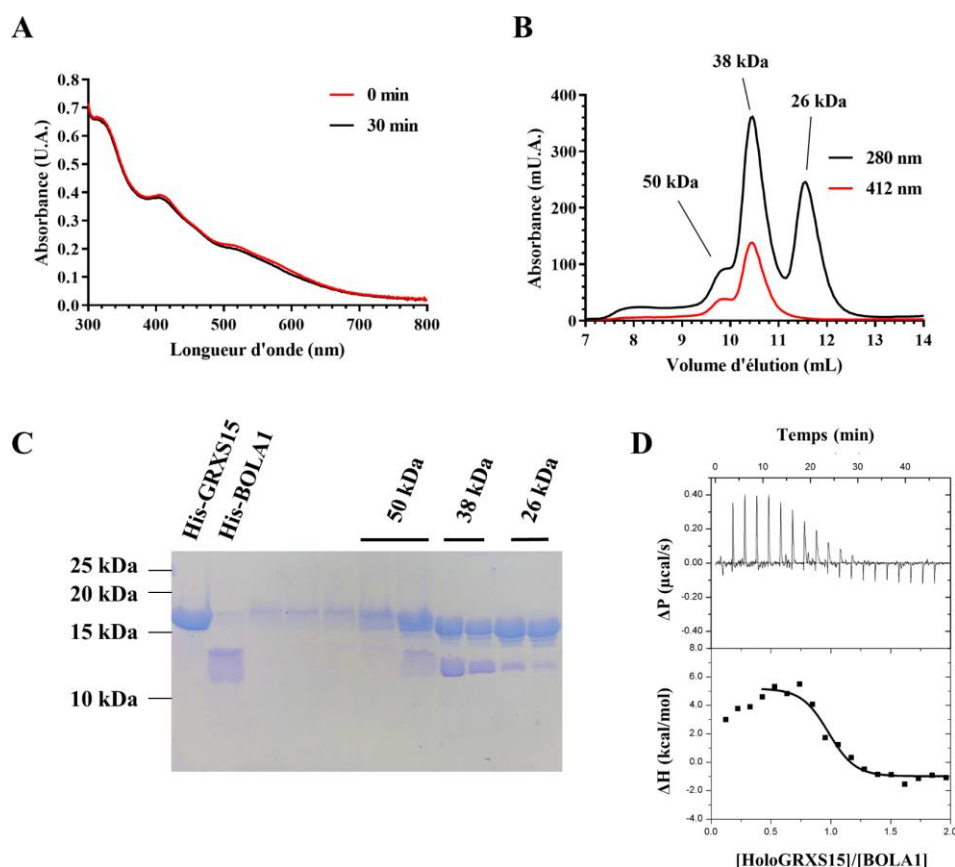
Afin d'induire la formation d'hétérodimères GRXS15-BOLA, les protéines BOLA1 ou BOLA4 ont été ajoutées à un échantillon d'holo-GRXS15. En effet, la conversion entre un homodimère de GRX et un hétérodimère GRX-BOLA (en principe plus stable) s'accompagne généralement d'un changement de la sphère de coordination du centre Fe-S qui induit une modification significative du spectre d'absorption UV-visible en fonction du temps, comme démontré pour certaines isoformes d'*E. coli*, de

*S. cerevisiae* et de l'Homme (Dlouhy *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2009, 2012). Si l'on considère la réaction ci-dessous, il a été décidé de ne pas ajouter de GSH car cela pourrait faciliter la formation et/ou la stabilité des hétérodimères (Dlouhy *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012) et ce même s'il a été rapporté que les hétérodimères formés par les isoformes humaines ne sont pas affectés par la présence de DTT et/ou de GSH (Nasta *et al.*, 2017).



### 3.3.a. GRXS15-BOLA1

Afin d'obtenir l'hétérodimère GRXS15-BOLA1 liant un centre Fe-S, environ 35  $\mu\text{M}$  d'holo-GRXS15 ont été incubés en équimolarité avec BOLA1 en condition anaérobie. Après 30 min d'incubation, le spectre d'absorption était stable (figure 25A) et la réaction est considérée comme complète. Les changements de spectre d'absorption paraissant minimes, le mélange réactionnel a été déposé sur chromatographie d'exclusion de taille, ce qui a permis la séparation de trois espèces distinctes (figure 25B).



**Figure 25. Analyse de la formation de l'hétérodimère GRXS15-BOLA1**

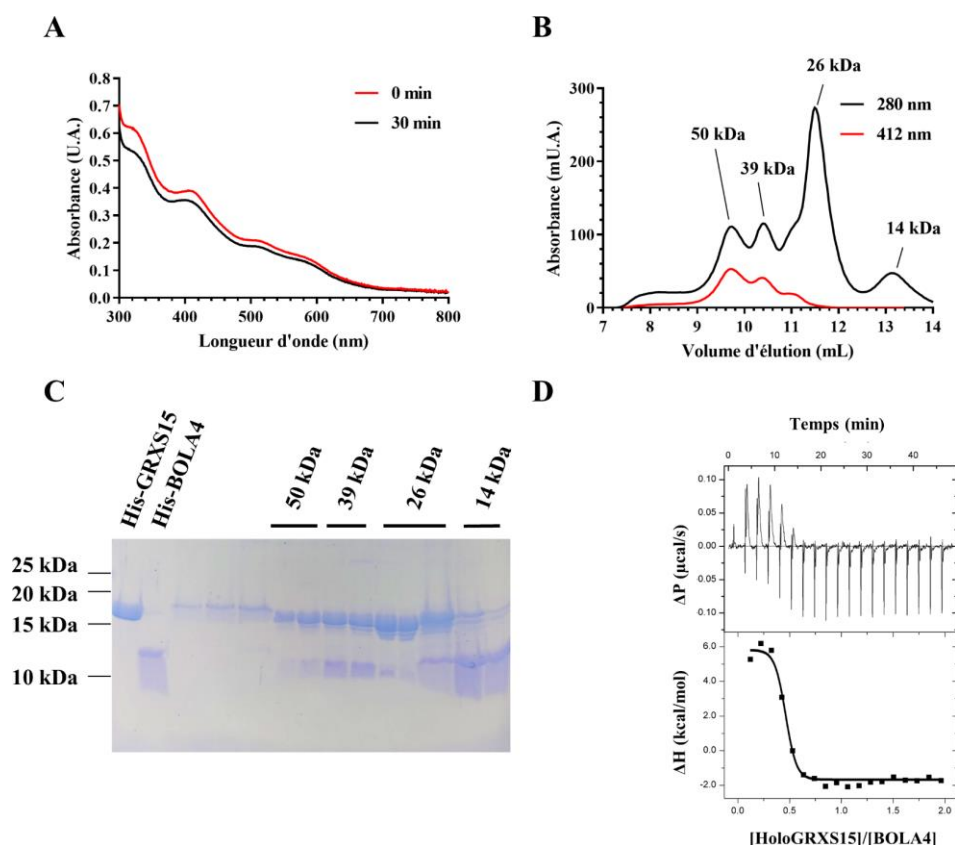
(A) Spectre d'absorption UV-visible d'holo-GRXS15 avant (rouge) et après (noir) 30 min d'incubation avec BOLA1. (B) Profil d'éluion à 280 nm (noir) et 412 nm (rouge) de l'échantillon d'holo-GRXS15 après incubation avec BOLA1, sur chromatographie d'exclusion de taille (S75 16/600) réalisée en aérobie. (C) Profil de migration des fractions obtenues après séparation sur chromatographie d'exclusion de taille (S75 16/600) de l'échantillon d'holo-GRXS15 après incubation avec BOLA1 sur SDS-PAGE 15%. (D) Données ITC brutes (fenêtre supérieure) et intégrées (fenêtre inférieure) de la titration de BOLA1 (250  $\mu\text{M}$ ) sur holo-GRXS15 (25  $\mu\text{M}$ ) en condition aérobie.

En accord avec l'analyse des fractions sur gel SDS-PAGE (figure 25C), j'ai conclu que la fraction s'éluant à un volume de 9,8 mL correspondait très probablement à une partie d'holo-GRXS15 résiduelle. On retrouve une masse moléculaire estimée d'environ 50 kDa comme précédemment (section III.2). Le second pic élué à un volume de 10,5 mL correspond à une espèce ayant une masse moléculaire estimée de 38 kDa. Puisque GRXS15 (26 kDa apparent) et BOLA1 (14 kDa apparent) sont retrouvées en équimolarité au niveau de ce pic, j'ai conclu à la formation d'un hétérodimère GRXS15-BOLA1, mais celui-ci était retrouvé à une masse apparente différente de l'hétérodimère formé après co-expression des protéines (25 kDa). Cette différence pourrait être attribuée à la présence d'une étiquette histidine supplémentaire sur GRXS15, absente lors de l'expérience de co-purification. Puisque cette conversion induit le relargage d'un monomère de GRXS15, il n'est pas surprenant de retrouver un troisième pic élué à 11,5 mL qui contient très majoritairement GRXS15. Visiblement, la formation de l'hétérodimère GRXS15-BOLA1 n'induit pas de changements du spectre d'absorption, comme c'était le cas pour les isoformes mitochondriales humaines (HsGLRX5 vs HsGLRX5-HsBOLA1) (Brancaccio *et al.*, 2014; Nasta *et al.*, 2017). Néanmoins, il est intéressant de noter que l'absence de BOLA1 sous sa forme monomérique laisse supposer que (i) dans les conditions utilisées (*ie* sans GSH dans le milieu réactionnel) l'équilibre de la réaction est en faveur de la formation de l'hétérodimère et que (ii) l'hétérodimère est suffisamment stable en condition aérobie pour effectuer cette chromatographie, contrairement à ce qui a été observé pour holo-GRXS15. Cette stabilité accrue pourrait résulter de la protection du centre Fe-S, vis-à-vis du solvant et de l'oxygène, par l'extension de la boucle située entre les brins  $\beta_1$  et  $\beta_2$  de BOLA1. Des expériences complémentaires seraient néanmoins nécessaires afin de valider/quantifier l'existence d'une stabilité accrue du centre Fe-S et son lien avec la présence de cette boucle.

Puisque l'approche par suivi spectrophotométrique n'est pas utilisable ici et en absence d'un appareil de dichroïsme circulaire, une titration calorimétrique isotherme de l'holo-forme de GRXS15 par BOLA1 a été tentée afin de suivre la formation d'un hétéro-complexe. Cependant, nous avons sans doute sous-estimé la complexité de l'interprétation des résultats puisque la réponse attendue lors de la formation de l'hétérodimère GRXS15-BOLA1 peut refléter au minimum la dissociation d'un monomère de GRXS15 et d'une molécule de GSH du complexe et l'association d'un monomère de BOLA1. Généralement, une association entre deux molécules résulte en un dégagement de chaleur, et donc une réaction exothermique. Or, les données obtenues révèlent une réaction globalement endothermique, une stœchiométrie du complexe d'environ 1:1 et une constante d'association de  $0,15 \mu\text{M}^{-1}$  (figure 25D). Ainsi, les échanges de chaleur observés corroborent l'existence d'une interaction et la formation d'hétérodimères mais il est compliqué d'en faire une interprétation plus poussée.

### 3.3.b. GRXS15-BOLA4

En suivant la même méthodologie, 35  $\mu\text{M}$  d'holo-GRXS15 ont été incubés en équimolarité avec BOLA4 en condition anaérobie. Au cours des 30 min d'incubation, une diminution globale des bandes d'absorption UV-visible spécifiques du centre Fe-S a été observée (figure 26A). Ceci pouvait indiquer une déstabilisation du centre Fe-S par BOLA4 ou son implication dans la sphère de coordination du centre Fe-S. A l'issue des 30 minutes, le mélange a donc été déposé sur chromatographie d'exclusion de taille.



**Figure 26. Analyse de la formation de l'hétérodimère GRXS15-BOLA4**

(A) Spectre d'absorption UV-visible d'holo-GRXS15 avant (rouge) et après (noir) 30 min d'incubation avec BOLA4. (B) Profil d'élution à 280 nm (noir) et 412 nm (rouge) de l'échantillon sur chromatographie d'exclusion de taille (S75 16/600) en aérobie. (C) Profil de migration sur SDS-PAGE 15% des fractions obtenues après séparation sur chromatographie d'exclusion de taille. (D) Données ITC brutes (fenêtre supérieure) et intégrées (fenêtre inférieure) de la titration de BOLA1 (250  $\mu\text{M}$ ) sur holo-GRXS15 (25  $\mu\text{M}$ ) en condition aérobie.

Quatre espèces distinctes, présentes en solution après incubation d'holo-GRXS15 avec BOLA4, ont été séparées par chromatographie d'exclusion de taille. On observe à nouveau la présence d'homodimère et de monomère de GRXS15 s'éluant respectivement à un volume de 9,8 mL et 11,5 mL. BOLA4 est quant à elle retrouvée à un volume d'élution de 13,1 mL correspondant à une masse moléculaire apparente de 15,3 kDa, de 10 kDa inférieure à celle estimée pour GRXS15. Enfin le dernier pic, ayant un volume d'élution de 10,4 mL, contient une espèce ayant une masse moléculaire apparente de 39,5 kDa dont la masse moléculaire est inférieure de 10 kDa à celle de l'homodimère de GRXS15. L'analyse

des fractions correspondantes sur SDS-PAGE indique que les protéines GRXS15 et BOLA4 sont présentes à une stœchiométrie d'environ 1:1 et donc que ce pic pourrait contenir l'hétérodimère GRXS15-BOLA4, au moins en partie sous forme holo comme l'indique l'absorbance à 412 nm (figure 26B et 26C). La présence de quantités importantes de BOLA4 et GRXS15 sous formes monomériques suggère que dans ces conditions, la réaction entre BOLA4 et holo-GRXS15 est incomplète, que le complexe GRXS15-BOLA4 est instable et/ou que l'interaction est transitoire.

Dans le cas de l'interaction entre GRXS15 et BOLA4, l'étude par titration calorimétrique isotherme révèle à nouveau une réaction globalement endothermique cependant la stœchiométrie du complexe serait cette fois d'environ 0,5 :1 et la constante d'association serait égale à  $0,33 \mu\text{M}^{-1}$  (figure 26D). La stœchiométrie du complexe attendue étant de 1 :1, les résultats obtenus semblent étonnants. Cela pourrait toutefois résulter de l'instabilité observée du complexe GRXS15-BOLA4 en condition aérobie. En effet, la dissociation d'un complexe pourrait entraîner la libération d'un monomère de BOLA4 alors disponible pour interagir avec un homodimère de GRXS15 et ainsi fausser les mesures. Dans ces conditions, la réalisation de cette étude en condition anaérobie semble nécessaire afin de vérifier les résultats obtenus.

En résumé, les données obtenues sont concordantes avec les études réalisées avec les protéines humaines, qui indiquent que l'holo-hétérocomplexe formé entre HsGLRX5 et HsBOLA3 est moins stable que celui formé entre HsGLRX5 et HsBOLA1 (Nasta *et al.*, 2017; Uzarska *et al.*, 2016). D'ailleurs, aucun hétérocomplexe n'est observé par analyse en chromatographie d'exclusion de taille quand HsBOLA3 est incubée avec holo-HsGLRX5 (Uzarska *et al.*, 2016). La combinaison de ces analyses biochimiques avec les études génétiques réalisées avec les mutants de levure (Melber *et al.*, 2016; Uzarska *et al.*, 2016) suggérait que les protéines BolA1/bol1 agiraient plutôt avec GRX5 à une étape nécessitant des centres [2Fe-2S], tandis que BolA3/bol3 agiraient indépendamment de GRX5 mais avec les protéines NFU, à des étapes nécessitant des centres [4Fe-4S]. Cette hypothèse était renforcée par le fait qu'une interaction entre HsBOLA3 et HsNFU1 sous forme holo a été mise en évidence par thermophorèse (Melber *et al.*, 2016; Uzarska *et al.*, 2016), qu'une co-régulation entre les gènes codant pour ScGrx5 et ScBol1 existe chez la levure, et que les partenaires protéiques de HsNFU1 et de HsBOLA3 (mais pas de HsBOLA1) sont semblables (e.g. ISCA et autres protéines clientes dont la lipoate synthase) (Melber *et al.*, 2016). Il avait ainsi été suggéré que BOLA3 puisse stabiliser le centre [4Fe-4S] lié à NFU1, sans participer cependant à la liaison du centre Fe-S. Néanmoins, des analyses biochimiques et spectroscopiques réalisées par RMN n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction de BOLA3 avec une forme apo ou holo de NFU1 liant un centre [4Fe-4S] que cela soit en absence et en présence de GLRX5 (Nasta *et al.*, 2020). Par contre, ce qui a été mis en évidence est un transfert de centre Fe-S d'un hétérocomplexe GLRX5-BOLA3 vers une apo-NFU1 pour former, en présence de DTT utilisé comme réducteur chimique, un centre [4Fe-4S] lié par une forme dimérique de



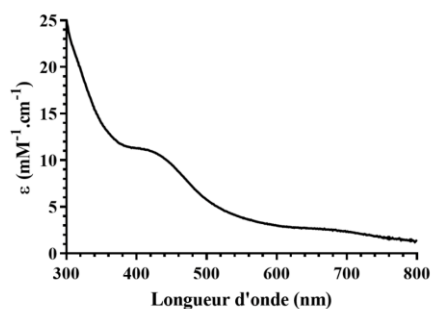
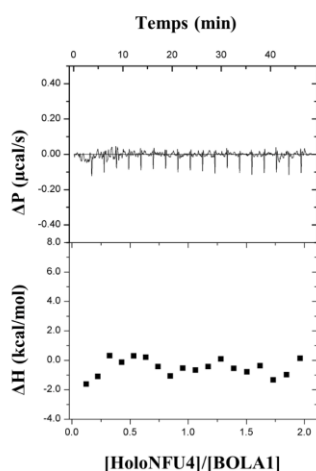
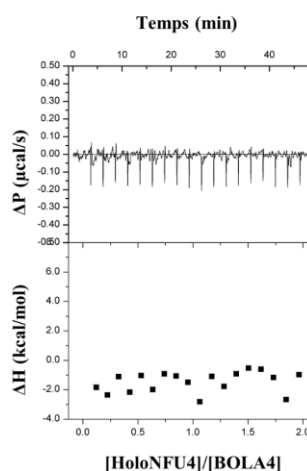
NFU1 (Nasta *et al.*, 2020). Cette réaction n'est pas observée à partir d'un holo-homodimère de GLRX5 en absence de BOLA3.

Dans ce contexte et puisque les données obtenues pour les protéines humaines (Nasta *et al.*, 2020) n'étaient pas publiées/connues au démarrage de ce travail, j'ai exploré les différentes possibilités d'interaction bi- ou tri-partite entre GRXS15, BOLA1/4 et NFU4 de plantes. Pour cela, j'ai notamment évalué l'interaction des protéines BOLA avec NFU4 et la formation d'un centre [4Fe-4S] sur la protéine NFU4 en utilisant les holoformes d'un homodimère de GRXS15 ou d'un hétérodimère GRXS15-BOLA4 comme donneurs.

### 3.4. Formation de centre [4Fe-4S] sur la protéine NFU4

#### 3.4.a. Reconstitution chimique de NFU4 et test d'interaction avec les protéines BOLA

La première étape a été d'entreprendre au laboratoire la reconstitution *in vitro* du centre [4Fe-4S] de la protéine NFU4 purifiée sous forme d'apo-protéine puisque cela avait été réalisé précédemment dans le cadre d'une collaboration par le Pr Johnson. Plutôt que la réaction semi-enzymatique réalisée précédemment pendant 50 minutes et contenant notamment un excès de 12-fois en fer et en cystéine (Azam *et al.*, 2020b), j'ai préféré une reconstitution chimique à partir d'une protéine pré-réduite au TCEP et incubée avec un excès 3-fois de fer et de soufre, en rapport avec la stœchiométrie du complexe [4Fe-4S]:NFU4<sub>2</sub> attendue, en présence de DTT.

**A****B****C**

**Figure 27. Reconstitution chimique d'holo-NFU4 et test d'interaction avec les protéines BOLA**

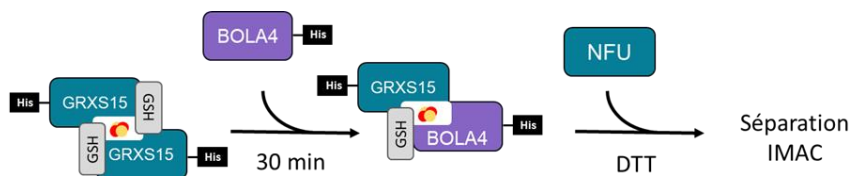
(A) Le spectre d'absorption UV-visible d'holo-NFU4 obtenu après reconstitution chimique en présence de DTT a été mesuré et les valeurs obtenues transformées en coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) en se basant sur la concentration protéique. Données ITC brut (fenêtre supérieure) et intégrées (fenêtre inférieure) de la titration (B) de BOLA1 (250  $\mu\text{M}$ ) sur holo-NFU4 (25  $\mu\text{M}$ ) et (C) de BOLA4 (250  $\mu\text{M}$ ) sur holo-NFU4 (25  $\mu\text{M}$ ) en condition aérobie.

Après 30 minutes d'incubation, le fer et le soufre excédentaires et le DTT présents dans la réaction ont été éliminés et le spectre d'absorption UV-visible de l'échantillon mesuré entre 240 et 800 nm. Les valeurs d'absorbance obtenues pour chaque longueur d'onde ont été transformées en coefficient d'extinction molaire de l'homodimère sur la base des concentrations protéiques déterminées par dosage BCA (figure 27A). Le spectre d'absorption UV-visible possède les mêmes caractéristiques que celui précédemment rapporté (Azam *et al.*, 2020b) avec deux bandes d'absorption larges centrées vers 320 et 410 nm, qui sont caractéristiques des centres [4Fe-4S]. Bien que les dosages de fer réalisés sur l'échantillon indiquaient la présence d'environ 4,4 Fe/homodimère et coïncidaient donc avec la présence d'un centre [4Fe-4S], la valeur de coefficient d'extinction molaire du dimère à 400 nm est légèrement inférieure ( $\epsilon_{400\text{ nm}} = 11,3\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ;  $A_{400\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} = 0,23$ ) à celle préalablement rapportée ( $\epsilon_{400\text{ nm}} = 15\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ;  $A_{400\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} = 0,28$ ) (Azam *et al.*, 2020b). Néanmoins, cela nous a permis de tester l'interaction entre une apo- ou une holo-NFU4 et les protéines BOLA1/4 par titration

calorimétrique isotherme, même si l'étude est rendue complexe par le fait que l'appareil n'est pas situé dans une enceinte anaérobie (figure 27B et 27C). Seuls les résultats obtenus avec une holo-NFU4 sont montrés mais ceux-ci ne permettent pas de conclure à une interaction. Cela corrobore l'absence d'interaction détectée entre une holo-HsNFU1 et HsBOLA3 par RMN (Nasta *et al.*, 2020) mais contraste avec la détection d'une interaction entre les protéines HsBOLA1 et HsBOLA3 avec la forme apo et holo d'HsNFU1 par thermophorèse en anaérobie (Uzarska *et al.*, 2016). Tout ceci indique bien que toutes les méthodes d'étude des interactions protéine-protéine ne se valent pas, que ce type d'analyse peut être très sensible au type de protéines étudiées mais aussi à de multiples paramètres qui peuvent varier entre laboratoires et qu'il s'avérera nécessaire d'utiliser d'autres méthodes pour tester ces interactions.

### 3.4.b. Couplage réductif de centre [2Fe-2S] sur NFU4 en présence de DTT

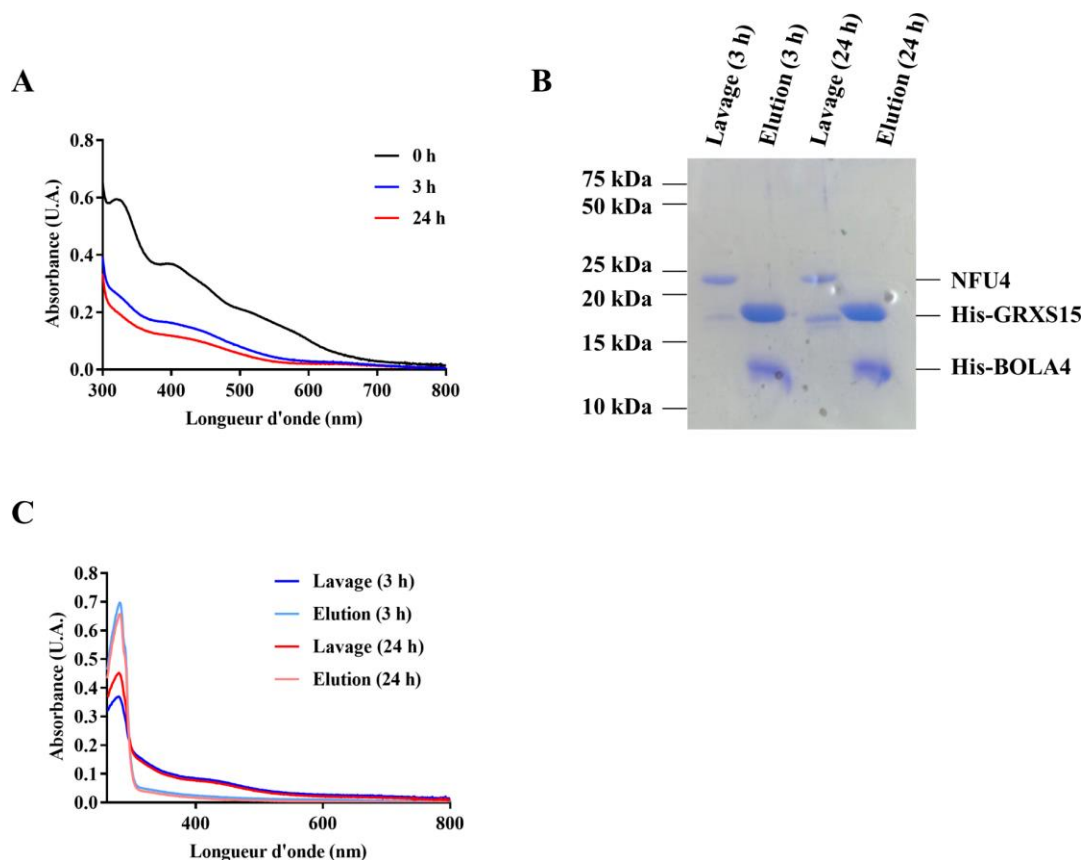
Afin de tester la capacité de l'hétérodimère GRXS15-BOLA4 à transférer son centre Fe-S à NFU4, la première étape a été l'obtention d'holo-GRXS15 par reconstitution chimique. La concentration en holo-GRXS15 a été estimée par mesure de l'absorbance à 412 nm et BOLA4 ajoutée en équimolarité. En théorie, deux holo-GRXS15 sont nécessaires à la formation d'un centre Fe-S sur un dimère de NFU4. Dans le but de favoriser la formation d'holo-NFU4, une quantité d'holo-GRXS15 deux fois supérieure à celle théoriquement nécessaire à l'obtention de 100% d'holo-NFU4 a été ajoutée dans le mélange réactionnel. Afin de réaliser le couplage réductif des centres  $[2Fe-2S]^{2+}$  en centre  $[4Fe-4S]^{2+}$ , le DTT a été choisi comme donneur d'électrons à l'instar de l'étude réalisée avec les protéines humaines (figure 28), dans laquelle le système ferrédoxine n'a pas été testé et le GSH s'est avéré inefficace bien qu'une interaction entre HsNFU1 et le GSH ait été mise en évidence (Nasta *et al.*, 2020). Puisque l'étude réalisée avec les protéines GRXS15 et ISCA de plantes (Azam *et al.*, 2020a) indique que le GSH permet le couplage réductif des centres Fe-S entre ces protéines, l'effet de la présence ou de l'absence de GSH au cours de la réaction a également été testé. Les résultats obtenus étant similaires, seuls ceux obtenus en absence de GSH sont présentés.



**Figure 28. Schéma récapitulatif de la procédure expérimentale utilisée pour le couplage réductif de centre [2Fe-2S] en centre [4Fe-4S] sur NFU4 en présence de DTT**

Le spectre d'absorption UV-visible du mélange est suivi à intervalle de temps régulier afin d'évaluer le temps de réaction à partir duquel il n'y a plus de variations. Après 3 h et 24 h d'incubation,

les protéines ont été séparées par chromatographie d'affinité métallique du fait de la présence d'étiquettes poly-histidine au niveau de GRXS15 et de BOLA4 mais pas de NFU4.



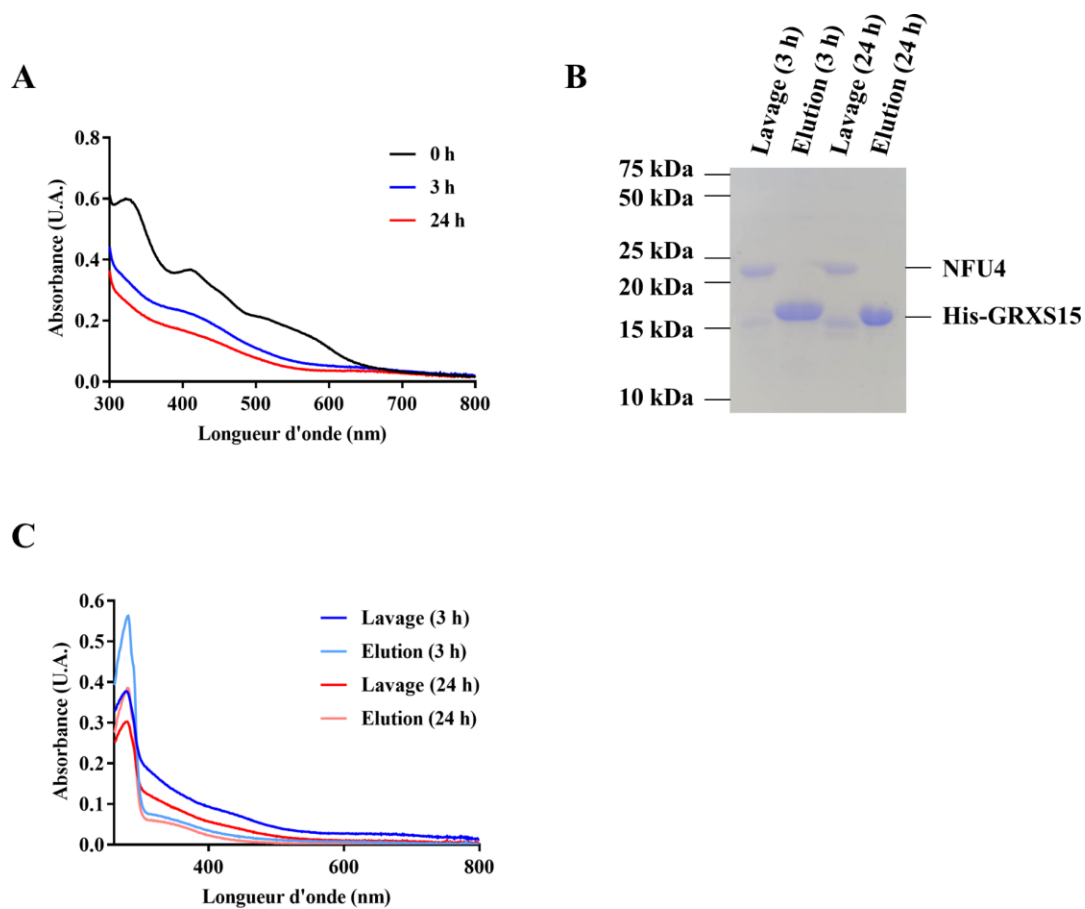
**Figure 29. Analyse du transfert de centre Fe-S depuis l'hétérodimère GRXS15-BOLA4 vers NFU4 en présence de DTT**

(A) Spectre d'absorption UV-visible d'holo-GRXS15 avant (noir) et après 3 h (bleu) et 24 h (rouge) d'incubation avec BOLA4 et NFU4 en présence de DTT. (B) Profil protéique des fractions obtenues après séparation sur IMAC par SDS-PAGE 15%. (C) Spectre d'absorption UV-visible des fractions IMAC de lavage après 3 h (bleu) et 24 h (rouge), et d'éluion après 3 h (bleu ciel) et 24 h (rose).

Au cours de l'incubation, les bandes d'absorption caractérisant le centre [2Fe-2S] initialement lié par GRXS15 s'étaient estompées (figure 29A). Après 3h, le spectre d'absorption UV-visible présentait des bandes d'absorption larges à 320 nm et 400 nm suggérant la formation d'un centre [4Fe-4S] (figure 29A). La stabilisation du spectre d'absorption UV-visible suggérait que la réaction était complète mais une partie a été quand même incubée sur un temps plus long (24h). L'analyse des fractions séparées sur IMAC a confirmé que NFU4 était bien présente dans la fraction de lavage (i.e. non retenue sur IMAC et éventuellement avec une faible proportion de GRXS15) alors que les protéines GRXS15 et BOLA4 étaient retrouvées dans la fraction d'éluion (figure 29B). Le spectre d'absorption UV-visible de la fraction contenant NFU4 montre la présence de bandes d'absorption caractéristiques de la présence de centre [4Fe-4S] (Lavage (24h) :  $A_{400 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}} = 0,17$ ) et les dosages indiquaient la présence de 1,6 atomes de fer et 1,7 atomes de soufre par monomère, suggérant un taux d'occupation de centre [4Fe-4S] sur un homodimère de NFU4 d'environ 80% (figure 29C). En revanche, on peut

observer l'absence de signaux indiquant la présence de centre [2Fe-2S] dans la fraction contenant GRXS15 et BOLA4 (figure 29C). Il semblerait donc, en tenant compte de l'excès d'holo-GRXS15 initialement présent, qu'une partie des centres [2Fe-2S] se soit dégradée au cours de la réaction. Les dosages de fer et de soufre réalisés sur cette fraction indiquent la présence de 0,4 atomes de fer par protéine mais aucun atome de soufre. A titre de comparaison, ce type de réaction réalisée avec les protéines humaines mène à l'obtention de 65 % d'holo-HsNFU1 après incubation du complexe [2Fe-2S]:HsGLRX5:BOLA3 et d'apoHsNFU1 à un rapport de 1:1 (Nasta *et al.*, 2020).

La présence de BOLA3 étant strictement requise pour permettre la formation d'un centre [4Fe-4S] sur NFU1 par GLRX5 humaine (Nasta *et al.*, 2020), la même expérience a été réalisée en présence d'holo-GRXS15 uniquement et donc en absence de BOLA4.



**Figure 30. Analyse du transfert de centre Fe-S depuis holo-GRXS15 vers NFU4 en présence de DTT**  
**(A)** Spectre d'absorption UV-visible d'holo-GRXS15 avant (noir) et après 3 h (bleu) et 24 h (rouge) d'incubation avec NFU4 en présence de DTT. **(B)** Profil protéique des fractions obtenues après séparation sur IMAC par SDS-PAGE 15%. **(C)** Spectre d'absorption UV-visible des fractions IMAC de lavage après 3 h (bleu) et 24 h (rouge), et d'élution après 3 h (bleu ciel) et 24 h (rose).

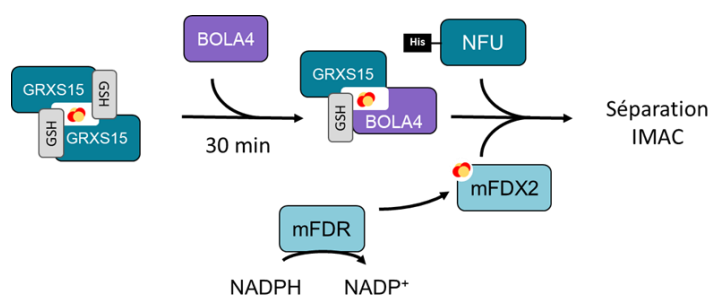
Les résultats obtenus sont globalement similaires à ceux observés en présence de BOLA4. Ainsi, le spectre d'absorption UV-visible évolue vers l'apparition de bandes d'absorption suggérant la formation de centre [4Fe-4S] après 3h et 24h (figure 30A). Après séparation de GRXS15 et NFU4 par chromatographie d'affinité métallique, ces bandes d'absorption se retrouvent dans la fraction contenant

NFU4 (Lavage (24h) :  $A_{400\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} = 0,19$ ) qui présente en moyenne 1,6 atomes de fer et 2,3 atomes de soufre par monomère (figure 30B et 30C). Dans la fraction contenant GRXS15, on retrouve 0,7 atomes de fer et 0,2 atomes de soufre par monomère. Encore une fois, l'excès de centre [2Fe-2S] initialement apporté par holo-GRXS15 n'est plus visible suggérant une dégradation progressive au cours de la réaction.

En résumé, l'utilisation de DTT en tant que donneur d'électrons induit la formation de centre Fe-S sur NFU que ce soit en présence ou en absence de BOLA4, contrairement à ce qui avait été observé lors de l'étude des protéines humaines (Nasta *et al.*, 2020). Cependant, les conditions utilisées ne permettent pas la détection des centres [2Fe-2S] apportés en excès dans la fraction contenant GRXS15 ou GRXS15 et BOLA4 après séparation par chromatographie d'affinité métallique. Cela nous empêche donc d'affirmer que la présence de centre Fe-S sur NFU est bien due à une interaction protéique et non à une dégradation progressive des centres [2Fe-2S] liés à GRXS15. Les résultats obtenus étant similaires en présence de GSH et de DTT, cela suggère que l'effet stabilisateur du GSH (section III.2) n'est pas suffisant sur le pas de temps de la réaction pour permettre la détection des centres [2Fe-2S] apportés en excès après séparation des protéines. Je me suis donc focalisé sur la recherche d'un moyen permettant de diminuer le temps nécessaire au transfert de centres Fe-S vers NFU4.

#### 3.4.c. Couplage réductif de centre [2Fe-2S] sur NFU4 en présence de ferrédoxine

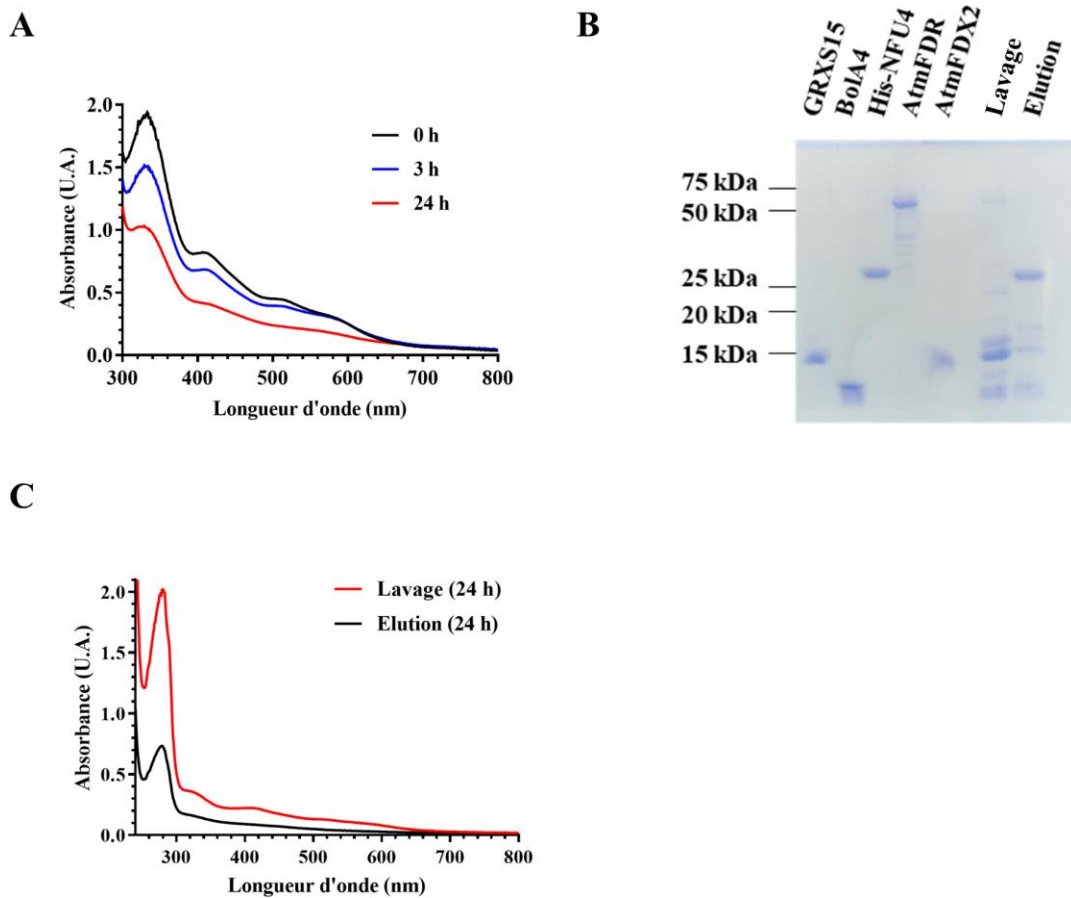
Afin de mimer un possible système de réduction physiologique, d'améliorer la vitesse de transfert et de fait limiter de potentiels réactions de dégradation des centres Fe-S, des essais ont été effectués en présence de la FDX2 mitochondriale d'*A. thaliana*, de la ferrédoxine réductase (FDR) et de NADPH. A noter que dans ce cas, une version étiquetée de NFU4 a été utilisée afin de permettre sa séparation de toutes les autres protéines non étiquetées (FDX2, FDR, GRXS15 et BOLA4) (figure 31).



**Figure 31. Schéma récapitulatif de la procédure expérimentale utilisée pour le couplage réductif de centre [2Fe-2S] en centre [4Fe-4S] sur NFU4 en présence du système mFDX2/mFDR/NADPH**

La présence initiale de 200  $\mu\text{M}$  de NADPH dans le milieu réactionnel empêchait l'attribution du signal mesuré à 320 nm uniquement à la présence des centres Fe-S présents et par conséquent de relier celui-ci à l'évolution de la quantité d'un type de centre Fe-S. Une diminution générale de l'absorbance comprise entre les longueurs d'onde de 400 et 650 nm était toutefois observée avec le

temps, ce qui suggérait une diminution de la quantité de centres [2Fe-2S] présents et donc un possible couplage en centre [4Fe-4S] (figure 32A). Néanmoins, contrairement à ce qui était attendu, la réaction ne semblait pas avoir été accélérée par le remplacement du DTT par le système FDX/FDR.



**Figure 32. Analyse du transfert de centre Fe-S depuis l'hétérodimère GRXS15-BOLA4 vers NFU4 en présence de mFDX2/mFDR**

(A) Spectre d'absorption UV-visible d'holo-GRXS15 avant (noir) et après 3 h (bleu) et 24 h (rouge) d'incubation avec BOLA4 et NFU4 en présence de mFDX2/mFDR. (B) Gel SDS-PAGE 15% montrant les profils protéiques des fractions obtenues après séparation des protéines sur chromatographie d'affinité métallique (IMAC). (C) Spectre d'absorption UV-visible des fractions de lavage (noir) et d'élution (rouge) après 24 h d'incubation, obtenues après séparation des protéines sur IMAC.

Après séparation des protéines par chromatographie d'affinité, la fraction d'élution contenait NFU4 ainsi qu'une faible proportion de protéines pouvant correspondre à GRXS15 et BOLA4 alors que les autres protéines étaient bien retrouvées dans la fraction de lavage (figure 32B). Dans cette fraction, on retrouvait des bandes d'absorption plutôt typiques de la présence de centre [2Fe-2S] qui doivent correspondre à une partie des centres [2Fe-2S]<sup>2+</sup> initialement liés par holo-GRXS15 et qui seraient encore intacts après 24 h d'incubation, mais également au centre lié par FDX2 (5  $\mu$ M) (figure 32C). Les dosages de fer et de soufre réalisés sur cette fraction indiquent la présence d'environ 0,4 atomes de fer et 0,5 atomes de soufre par protéine. D'un autre côté, le spectre d'absorption UV-visible de la fraction contenant NFU4 montrait des bandes d'absorption à 320 nm et 400 nm représentatives de la présence de centre [4Fe-4S] (Elution (24h) :  $A_{400 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}} = 0,13$ ) et la présence d'environ 0,8 atomes de fer et

0,9 atomes de soufre par protéine (figure 32C). Ces quantités de fer et de soufre indiquent donc la présence d'environ 40% d'holo-NFU4.

En conclusion, l'utilisation du système de transfert d'électrons FDX2/FDR/NADPH n'a pas permis l'accélération escomptée de la réaction. En revanche la persistance des centres Fe-S présents sur les donneurs après 24 h d'incubation pourrait suggérer un transfert spécifique vers NFU4 et non une conséquence de la dégradation des centres Fe-S initialement présents sur GRXS15. Cependant, la formation d'un centre [4Fe-4S] sur NFU4 nécessite la réduction du fer ferreux présent au sein du centre [2Fe-2S]<sup>2+</sup> lié par GRXS15. Dans ces conditions, il semble peu probable que le système FDX2/FDR/NADPH puisse réduire le Fe<sup>3+</sup> potentiellement libéré à la suite de la dégradation du centre Fe-S de GRXS15. Malgré tout, la réaction est partielle et le temps d'incubation nécessaire à la réaction ne permet pas de conclure avec certitude qu'une interaction spécifique entre le complexe GRXS15-BOLA4 et NFU4 a bien été observée. Afin de vérifier cette hypothèse, les expérimentations en présence de DTT et du système FDX2/FDR/NADPH devraient être répétées en présence d'un chélateur de métaux permettant de séquestrer le fer potentiellement libéré par la dégradation du centre Fe-S lié à GRXS15. Cela implique cependant que le chélateur utilisé n'influe pas sur la ligation des centres Fe-S liés par holo-GRXS15, l'hétérocomplexe GRXS15-BOLA4 et/ou holo-NFU4 sur le pas de temps de la réaction.

La limite majeure de la méthode utilisée au cours de cette étude est l'impossibilité de suivre la réaction en temps réel ou de stopper la réaction à un intervalle de temps réduit (*ie* toutes les 15 – 30 min environ). En effet, la quantité de protéines nécessaire à la titration du fer et du soufre ainsi que le temps nécessaire à la séparation des protéines (environ 30 – 45 min) ne permet pas un suivi régulier. L'utilisation d'un spectropolarimètre afin de suivre en temps réel les modifications du spectre de dichroïsme circulaire (DC) de l'échantillon permettrait de palier à cette contrainte technique. Néanmoins, une comparaison des spectres DC des trois espèces (*ie* holo-GRXS15, holo-GRXS15-BOLA4 et holo-NFU4) doit être réalisée en amont. Les spectres DC d'holo-GRXS15 et holo-NFU4 ont déjà été mesurés (Azam *et al.*, 2020a, 2020b) et diffèrent notamment à une longueur d'onde de 460 nm, ce qui pourrait permettre de suivre la formation de centres [4Fe-4S] sur NFU4 dans les conditions souhaitées. La mesure du spectre DC d'holo-GRXS15-BOLA4 reste cependant nécessaire afin de vérifier qu'aucune bande DC spécifique de ce complexe n'interfère avec l'analyse.

Il serait également intéressant de tester la capacité de l'hétérodimère GRXS15-BOLA1 à transférer son centre Fe-S en présence du système FDX2/FDR/NADPH. Une redondance fonctionnelle des protéines BOLA mitochondriales de plante est envisageable à la vue des résultats obtenus lors de l'analyse des protéines de levure. En effet bien que l'activité des enzymes liant des centres Fe-S ne soient pas ou peu affectées chez les souches simple-mutantes *bol1* et *bol3*, un défaut de maturation de de protéines à centre [4Fe-4S] (SDH et HiPIP, une ferrédoxine bactérienne) et de protéines dépendantes du cofacteur lipoate (PDH, OGDH) a été observé chez le double mutant *bol1/3* (Uzarska *et al.*, 2016). En revanche, chez l'Homme les patients atteints d'une mutation de BOLA3 présentent des défauts



d'activités enzymatiques similaires à ceux observés chez le double mutant de levure *bol1/bol3* (Cameron *et al.*, 2011). Cela suggère une divergence fonctionnelle des protéines BOLA1 et BOLA3 humaines concordante avec l'incapacité du complexe GLRX5-BOLA1 à transférer son centre Fe-S à NFU1 (Nasta *et al.*, 2020). Déterminer la capacité du complexe GRXS15-BOLA1 à transférer son centre Fe-S à une NFU mitochondriale pourrait donc nous renseigner sur une potentielle redondance fonctionnelle entre BOLA1 et BOLA4 telle que cela a été observé lors de l'étude des isoformes de levure, ou une divergence fonctionnelle similaire à ce qui a été observé pour les protéines humaines.




## Chapitre 2 : Caractérisation des propriétés redox de GRXS15

La fonction des GRX, qu'elle soit en lien avec une activité oxydoréductase ou avec la fixation d'un centre Fe-S, est étroitement liée à l'état redox de leur(s) cystéine(s). L'objectif de cet axe a donc été d'évaluer si et comment les propriétés redox de la seule cystéine d'AtGRXS15 pouvaient interférer avec ce rôle. En effet lors de précédentes études, seule une faible activité d'oxydation de la roGFP<sub>2</sub> en présence de GSSG a pu être détectée suggérant que GRXS15 n'intervient pas ou peu dans la régulation des modifications post-traductionnelles des protéines mitochondriales et donc ne participe pas au maintien de l'homéostasie redox. Il a donc été entrepris (i) d'estimer la réactivité de cette cystéine *in vitro*, (ii) d'évaluer sa sensibilité vis-à-vis d'agents oxydants physiologiques potentiellement présents dans la mitochondrie chez les plantes et (iii) de mettre en évidence la capacité des systèmes de réduction mitochondriaux d'*A. thaliana* à réduire les différentes formes d'oxydation de la protéine. Pour ce faire, différentes méthodes basées notamment sur l'alkylation spécifique des résidus cystéinyles ont été utilisées afin de déterminer l'état redox de la cystéine de GRXS15 après différents traitements oxydants. Les résultats obtenus sont détaillés dans l'article « *Relationships between the Reversible Oxidation of the Single Cysteine Residue and the Physiological Function of the Mitochondrial Glutaredoxin S15 from Arabidopsis thaliana* » publié dans le journal « *Antioxidants* » et présenté ci-dessous.

En résumé, il a été montré que le pKa de la cystéine de GRXS15 est de 4,0 et par conséquent que la forme thiolate réactive doit être prépondérante *in cellulo*. Cette réactivité entraîne une sensibilité de la cystéine de GRXS15 à l'oxydation en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de GSSG, induisant respectivement une sulfénylation et une glutathionylation de la protéine pouvant conduire à sa dimérisation. De plus, la sensibilité exacerbée de la protéine à l'oxydation en présence de GSNO suggère qu'elle pourrait également subir une nitrosylation. Les potentiels redox des ponts disulfures intermoléculaires formés lors de la dimérisation et avec le GSH ont été déterminés à -305 et -280 mV respectivement. Il a également été montré que les systèmes de réduction mitochondriaux (NADPH/NTR/TRX, NADPH/GR/GSH) sont capables de réduire ces formes d'oxydation. Des résultats complémentaires, non intégrés dans cet article, sont présentés à la suite de l'article dans ce manuscrit.

## Article

# Relationships between the Reversible Oxidation of the Single Cysteine Residue and the Physiological Function of the Mitochondrial Glutaredoxin S15 from *Arabidopsis thaliana*

Loïck Christ <sup>1</sup> , Jérémy Couturier <sup>1,2</sup>  and Nicolas Rouhier <sup>1,\*</sup> <sup>1</sup> Université de Lorraine, INRAE, IAM, F-54000 Nancy, France<sup>2</sup> Institut Universitaire de France, F-75000 Paris, France

\* Correspondence: nicolas.rouhier@univ-lorraine.fr; Tel.: +33-372735157

**Abstract:** Glutaredoxins (GRXs) are widespread proteins catalyzing deglutathionylation or glutathionylation reactions or serving for iron-sulfur (Fe-S) protein maturation. Previous studies highlighted a role of the *Arabidopsis thaliana* mitochondrial class II GRXS15 in Fe-S cluster assembly, whereas only a weak glutathione-dependent oxidation activity was detected with the non-physiological roGFP2 substrate in vitro. Still, the protein must exist in a reduced form for both redox and Fe-S cluster binding functions. Therefore, this study aimed at examining the redox properties of AtGRXS15. The acidic pKa of the sole cysteine present in AtGRXS15 indicates that it should be almost totally under a thiolate form at mitochondrial pH and thus possibly subject to oxidation. Oxidizing treatments revealed that this cysteine reacts with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or with oxidized glutathione forms. This leads to the formation of disulfide-bridge dimers and glutathionylated monomers which have redox midpoint potentials of −304 mV and −280 mV, respectively. Both oxidized forms are reduced by glutathione and mitochondrial thioredoxins. In conclusion, it appears that AtGRXS15 is prone to oxidation, forming reversible oxidation forms that may be seen either as a catalytic intermediate of the oxidoreductase activity and/or as a protective mechanism preventing irreversible oxidation and allowing Fe-S cluster binding upon reduction.

**Keywords:** glutathione; glutaredoxin; cysteine oxidation; mitochondria

**Citation:** Christ, L.; Couturier, J.; Rouhier, N. Relationships between the Reversible Oxidation of the Single Cysteine Residue and the Physiological Function of the Mitochondrial Glutaredoxin S15 from *Arabidopsis thaliana*. *Antioxidants* **2023**, *12*, 102. <https://doi.org/10.3390/antiox12010102>

Academic Editor: Stanley Omaye

Received: 23 November 2022

Revised: 22 December 2022

Accepted: 27 December 2022

Published: 31 December 2022



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Glutaredoxins (GRXs) are ubiquitous proteins belonging to the thioredoxin (TRX) superfamily [1]. They adopt a canonical tridimensional structure composed of a central  $\beta$ -sheet formed by four  $\beta$ -strands classically surrounded by three  $\alpha$ -helices, but one or two extra  $\alpha$ -helices are sometimes present [2]. A cysteine or a pair of cysteines present in a CxxC/S motif is normally present in the loop preceding the helix  $\alpha$ 1. Most organisms possess two GRX classes, referred to as classes I and II, depending on their active site motifs and primary sequences [3].

Class I GRXs contain a CxxC/S active site motif and generally act as oxidoreductases [4,5], catalyzing protein glutathionylation/deglutathionylation reactions [6–8]. Noteworthy, some of them are able to bind an iron-sulfur (Fe-S) cluster, which is thought to serve for sensing oxidative conditions [9–12]. For their activity, redox active class I GRXs usually require a single catalytic cysteine even though one or two additional cysteines are sometimes present [5,10,13]. A recent study proposed the existence of two different glutathione recognition sites. A glutathione scaffold site allows the recognition of glutathionylated substrates [14]. This drives the oxidative half-reaction which consists in the nucleophilic attack of the catalytic cysteine thiolate on the glutathionylated substrate and results in the formation of a disulfide bridge between the GRX and the glutathione molecule. Then, the reductive half-reaction is achieved by a reduced glutathione (GSH) molecule that would bind in a so-called GSH activator site; however, evidence for the involved residues are

currently lacking [14]. After this step, GRXs are reduced, and an oxidized glutathione (GSSG) is formed but is efficiently reduced back to GSH by NADPH-dependent glutathione reductases. This catalytic mechanism is referred to as a monothiol mechanism since it involves only one cysteine of the GRX moiety. When the catalytic mechanism involves a second cysteine of the GRXs, for instance when GRXs catalyze the reduction of disulfide bonds formed between two cysteine residues of the partner proteins, it is referred to as a dithiol mechanism [5,15]. The second cysteine may be present either in the active site CxxC signature or in the C-terminal part of the protein. It is referred to later on as a semi-conserved cysteine since it is present in many class I or II GRXs but not all. In both cases, this leads to the formation of an intramolecular disulfide bridge that is reduced by GSH, TRXs, or TRX reductases depending on the cases [15–18].

Class II GRXs contain a very conserved CGFS signature and eventually the semi-conserved cysteine in the C-terminal region. They usually have no or little oxidoreductase activity [15–17,19,20] and they may be uniquely involved in the maturation of Fe-S proteins via their capacity to bind and transfer a [2Fe-2S] cluster [12]. In both class I and class II Fe-S cluster binding GRXs, the Fe-S cluster is usually bridged into homodimers via the first cysteine of the CxxC motif and the cysteine of two GSH molecules [12]. The different properties between class I and class II GRXs, i.e., redox activity vs. Fe-S cluster binding and transfer properties, have been the subject of intense research [14,21,22]. Some differences at the level of the loop preceding the active site motif (elongated in class II GRXs), of the active site motif itself (Gly and Phe in CGFS active site motif of class II GRXs vs. Pro/Ser and Tyr at the equivalent position in class I GRXs), or of the helix  $\alpha 3$  and following loop (basic residues in class I GRXs replaced by acidic or hydrophobic residues in class II GRXs) are thought to preclude recognition of glutathionylated substrates and/or deglutathionylation activity of class II GRXs and therefore to prevent their oxidoreductase activity.

The *Arabidopsis thaliana* GRXS15 (*AtGRXS15*) belongs to the class II GRXs and is the sole GRX present in mitochondria [19]. It is a protein essential for the maturation of Fe-S proteins in this organelle by receiving the preformed Fe-S cluster built up on the so-called ISCU scaffold proteins and transferring it notably to ISCA maturation factors or to acceptor proteins such as the mitochondrial ferredoxin 1 [19,23–25]. Using the roGFP2 as a tool for measuring the oxidoreductase activity in vitro, it was previously reported that *AtGRXS15* does not have the capacity to reduce roGFP2 in the presence of GSH, whereas a weak oxidation activity was observed in the presence of GSSG [14,19]. This suggested that the reductive half-reaction is altered in *AtGRXS15* but also raised the question of why roGFP2 is reduced when expressed in plant mitochondria [26,27]. Unlike most other class II GRXs and in particular the yeast and human GRX5 orthologs, *AtGRXS15* only possesses the cysteine present in the CGFS signature, which suggests that the reaction mechanism and/or oxidation forms adopted by *AtGRXS15* might be different from other class II GRXs. In yeast Grx5, the presence of the semi-conserved C-terminal cysteine allows the formation of an intramolecular disulfide in the apoform that is reduced by GSH albeit with a low efficiency [20], but also the binding of a [4Fe-4S] cluster into a dimer without relying on glutathione ligands [28]. Regardless of their capacity to catalyze oxidoreduction reactions or to bind an Fe-S cluster, an important prerequisite for both functions is that GRXs exist initially in a reduced form. However, they are present in subcellular compartments where oxidative reactions occur. In fact, in a study investigating the changes in the redox metabolism upon seed imbibition, *AtGRXS15* was identified as one of the mitochondrial proteins that undergoes significant reduction, indicating first that it is prone to oxidation and second that there is likely a NADPH-dependent pathway operating for reduction [29]. For the reasons detailed above, we sought to analyze the redox properties of a recombinant *AtGRXS15*. In particular, we measured the pKa of its single cysteine residue and its sensibility to various oxidants. Two oxidation forms, a glutathionylated monomer and an intermolecular disulfide-bridged dimer with close midpoint redox potentials, have been detected and shown to be reduced by GSH or mitochondrial TRXs o.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Heterologous Expression in *E. coli* and Protein Purification

The cloning of the sequence coding for the mature form of *A. thaliana* GRXS15 (AT3G15660) into the bacterial pET3d expression vector was previously described [24]. The *E. coli* C41(DE3) strain containing the helper pSBET plasmid [30] was used for protein expression. Bacteria were grown at 37 °C in a total volume of 3.2 L of LB medium, supplemented with 50 µg/mL of kanamycin and ampicillin. Protein expression was induced at the exponential phase by adding 100 µM of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside and bacterial cultures were further incubated at 37 °C for 5 h. Cells were harvested by centrifugation (Beckman Coulter JLA 8.1000; 20 min; 6200× *g*; 20 °C) and pellets were resuspended in 12 mL buffer A containing 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, and 1 mM EDTA and stored at −20 °C. Cell lysis was performed by sonication (20% amplitude; 3 times 1 min), then soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation (Beckman Coulter JA 25.50; 20 min; 39,000× *g*; 4 °C). The soluble fraction was precipitated by adding ammonium sulfate up to 30% and then 80% of the saturation in two successive steps separated by centrifugation (JA 25.50; 20 min; 39,000× *g*; 4 °C). Proteins having precipitated between 30 and 80% of the ammonium sulfate saturation were resuspended in 8 mL buffer B (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl) and incubated for 1 h with 20 mM EDTA and 2.5 mM potassium ferricyanide at 4 °C. The protein sample was then loaded on size exclusion chromatography (SEC) (ACA 44; Pall-BioSeptra) equilibrated with buffer A. Fractions containing the protein of interest were pooled and dialyzed against buffer C containing 30 mM Tris-HCl pH 8.0 and 1 mM EDTA and incubated for 1 h with 10 mM DTT at 4 °C before loading on Q-sepharose column equilibrated with buffer C. Retained proteins were then eluted using a linear 0–400 mM NaCl gradient. Interesting fractions were pooled, concentrated in 1 mL using an Amicon cell equipped with YM10 membrane, and loaded on a Superdex S75 16/600 column equilibrated with buffer B and coupled to a FPLC system (Äkta purifier). Fractions containing monomeric *AtGRXS15* were then concentrated. Sample purity was assessed through SDS-PAGE and sample concentration was determined spectrophotometrically using a theoretical molar extinction coefficient at 280 nm of 8480 M<sup>−1</sup>.cm<sup>−1</sup>. The other proteins used in this work, *A. thaliana* TRXo1, TRXo2, and NADPH-dependent thioredoxin reductase B (NTRB) were purified as previously described [31,32].

### 2.2. pKa Determination

For its reduction, *AtGRXS15* (200 µM) was incubated with a 20-fold molar excess of TCEP for 1 h at 4 °C before desalting using Zeba spin columns (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Pre-reduced *AtGRXS15* (10 µM) was incubated in buffers ranging from pH 2.0 to 8.0 (100 mM citrate buffers are used from pH 2.0 to 6.0, and 100 mM phosphate buffers from pH 6.5 to 8.0) containing 200 µM 5-iodoacetamido-fluorescein (5-IAF) for 15 min at room temperature (RT) in the dark [33]. Proteins were then precipitated with 10% trichloroacetic acid (TCA) and, after 15 min at 4 °C, centrifuged at 13,000× *g* for 10 min at 4 °C. The pellets were washed with pure acetone and centrifuged at 13,000× *g* for 10 min at 4 °C. After resuspension in buffer D containing 100 mM Tris-HCl pH 8.0 and 1% SDS, fluorescence emission at 518 nm of each sample was measured for an excitation wavelength of 494 nm using a Variant Cary Eclipse fluorimeter. Gain settings to detect 5-IAF-labeled thiolate groups were adjusted before each experiment, therefore absolute values were transformed into %<sub>fluorescence</sub> with respect to the maximum and minimum values within the series using the following equation:

$$\%_{\text{fluorescence}} = (\text{fluorescence}_{\text{value}} - \text{fluorescence}_{\text{min}}) / (\text{fluorescence}_{\text{max}} - \text{fluorescence}_{\text{min}}) \times 100.$$

### 2.3. Sensibility to Oxidants

For oxidation reactions, pre-reduced *AtGRXS15* (13 µM) was incubated with 5- and 10-fold excess of the oxidizing agent (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSSG, GSNO) for 2 h at RT. Proteins were then

precipitated with 10% TCA and treated as described above (Section 2.2). After acetone evaporation, pellets were resuspended in buffer D supplemented with 2 mM mPEG24 and incubated for 10 min at RT. Then, samples were loaded on non-reducing SDS-PAGE. For quantitative assays, pre-reduced protein (5  $\mu$ M) was incubated with up to 10 mM of oxidants ( $H_2O_2$ , GSSG, GSNO) in buffer B for 1 h at RT. After this incubation period, mBBr (100  $\mu$ M) was added to all samples and further incubated for 20 min in the dark. Proteins were then precipitated on ice with 10% TCA and treated as described above (Section 2.2). Once acetone evaporated, the pellets were resuspended in buffer D and then fluorescence emission at 472 nm of each sample was measured for an excitation wavelength of 380 nm using a Variant Cary Eclipse fluorimeter. Gain settings to detect mBBr-labelled thiol groups were adjusted before each experiment, therefore absolute values were transformed into %fluorescence decrease to the respective initial value of pre-reduced protein using the following equation:

$$\%_{\text{fluorescence decrease}} = 100 - ((\text{measured fluorescence} - \text{fluorescence}_{\text{min}}) / (\text{fluorescence}_{\text{max}} - \text{fluorescence}_{\text{min}}) \times 100). \quad (1)$$

#### 2.4. Redox Potential Determination of Oxidized Forms

To obtain dimeric or glutathionylated AtGRXS15, reduced AtGRXS15 (200  $\mu$ M) was incubated for 2 h either with a 10-fold excess of  $H_2O_2$  (2 mM) or with 10 mM GSH followed by the addition of 6 mM  $H_2O_2$ , respectively. After reaction, samples were desalted using the Zeba Spin desalting column. Then, pre-oxidized proteins (10  $\mu$ M) were incubated for 2 h in 200  $\mu$ L of a 100 mM HEPES pH 7.0 buffer containing various ratios of DTT/DTT<sub>ox</sub> at a final concentration of 2 mM with defined redox potentials ranging from  $-220$  mV to  $-400$  mV [33]. After incubation, mBBr (2.5 mM) was added to each sample and further incubated for 20 min in the dark. Proteins were then precipitated on ice with 10% TCA and treated as described above (Section 2.2). Pellets were resuspended in buffer D, and fluorescence emission at 472 nm of each sample was measured for an excitation wavelength of 380 nm using a Variant Cary Eclipse fluorimeter. Gain settings to detect mBBr-labelled thiol groups were adjusted before each experiment, therefore absolute values were transformed into %fluorescence, taking into account that proteins were 100% reduced in buffer with the more electronegative  $E_m$  value and 100% oxidized in buffer with the less electronegative  $E_m$  value.

#### 2.5. Reduction Tests

Dimeric and glutathionylated proteins obtained as described above (Section 2.4) were incubated with two different reducing systems. The thioredoxin system included 200  $\mu$ M NADPH, 160 nM *A. thaliana* NTRB, and 2.5  $\mu$ M of mitochondrial AtTRXo1 or AtTRXo2. Reduction by glutathione was assessed using GSH concentrations comprised between 25  $\mu$ M and 50 mM. Reactions were performed in 50  $\mu$ L of 30 mM Tris-HCl pH 8.0 and started by adding pre-oxidized AtGRXS15 (13  $\mu$ M). After 15 or 60 min of incubation at RT, the reaction was stopped by adding 10% TCA and treated as described above (Section 2.2). The acetone-washed protein pellets were resuspended in buffer D supplemented with 2 mM mPEG24 and further incubated for 10 min at RT. Then, each sample was separated on non-reducing SDS-PAGE. For the GSH treatments, band intensities were quantified using an Odyssey gel scanner (LiCor) and corrected by subtraction of the background. The values were transformed as percentages of oxidized forms reduced, with the minimal and maximal values corresponding to 0 and 100%. The normalized percentages were plotted against GSH concentration.

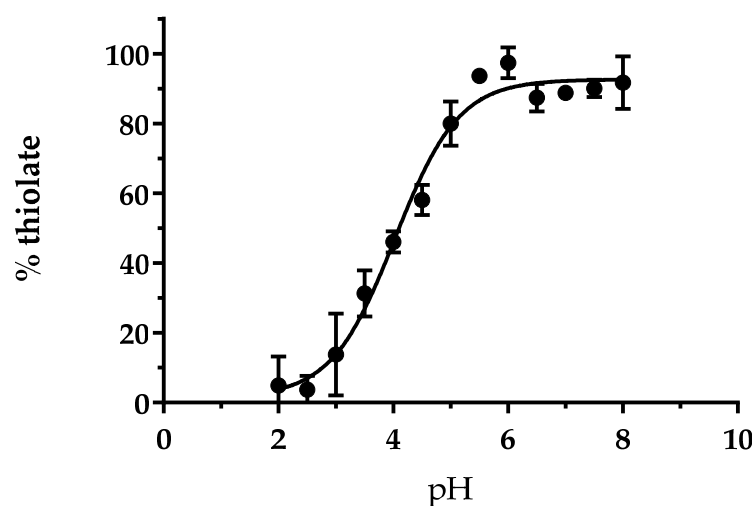
#### 2.6. Replicates

All results represent mean  $\pm$  standard deviation of at least three independent experiments. For SDS-PAGE, a gel representative of at least three independent experiments is shown.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. The Cysteine of AtGRXS15 Has an Acidic pKa

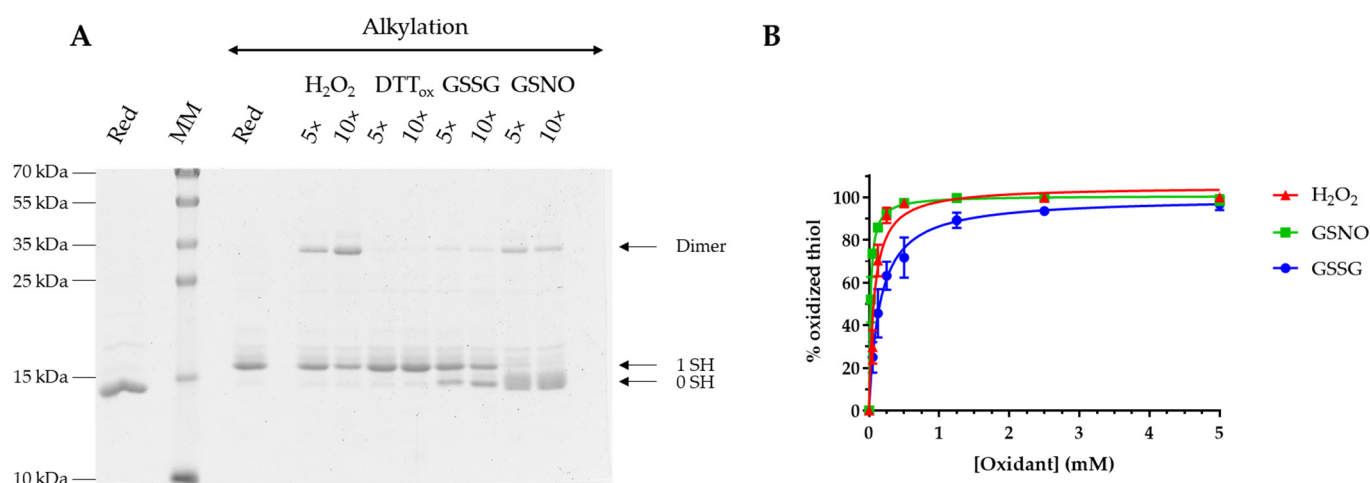
Previous studies using the classical hydroxyethylidisulfide (HED) and roGFP2 reduction assays demonstrated the absence of reductase activity for *AtGRXS15* using these two artificial substrates but a weak glutathionylation activity with roGFP2 [14,19]. Considering that the oxidoreductase activity notably relies on the reactivity of catalytic cysteine, we decided to determine the pKa of Cys91. Reduced *AtGRXS15* was incubated in different buffers ranging from pH 2.0 to 8.0 with 5-iodoacetamido-fluorescein, an alkylating agent able to react with thiolate but not thiol groups, thus allowing to discriminate both forms. From this experiment, we determined a pKa value of  $4.0 \pm 0.1$  (Figure 1). This pKa value is similar to those determined for the active site cysteine of class I GRXs from poplar [5,34,35] or *Chlamydomonas reinhardtii* [36], which ranged from 3.9 to 5.3, but also of class II GRXs as shown for *A. thaliana* GRXS16 (pKa~3.9) [15], and the yeast ortholog Grx5 (pKa~5.0) [20]. Overall, this indicates that Cys91 of *AtGRXS15* should predominantly exist under a thiolate form at physiological pH and should be reactive. While this might not be sufficient to confer an oxidoreductase activity with large protein substrates because other biochemical or structural features matter, it may make the protein prone to oxidation by small oxidizing agents.



**Figure 1.** pKa determination of the single cysteine of *AtGRXS15*. Pre-reduced recombinant *AtGRXS15* (10  $\mu$ M) was incubated for 15 min with 200  $\mu$ M 5-iodoacetamido-fluorescein (5-IAF) in buffers ranging from pH 2.0 to 8.0. Fluorescence emission values were then transformed into % thiolate and the values plotted against pH. Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

#### 3.2. AtGRXS15 Is Prone to Oxidation by Physiological Oxidants

To assess the sensitivity of *AtGRXS15* to oxidation, we treated the reduced protein with a 5- and 10-fold excess of  $H_2O_2$ , oxidized DTT (DTT<sub>ox</sub>), GSSG, and GSNO for 2 h. Afterwards, the remaining free thiols were alkylated with mPEG24 to separate oxidized and reduced forms on non-reducing SDS-PAGE. As a reference, a shift of 1.2 kDa due to mPEG24 alkylation is visible when comparing the migration of a reduced monomer that is alkylated or not. Unlike DTT<sub>ox</sub> which did not promote the oxidation of *AtGRXS15*, an  $H_2O_2$  treatment mainly induced the oxidation of *AtGRXS15* under a dimeric form whereas treatments with GSSG and GSNO mainly generated a monomeric oxidized form, although dimers are formed to some extent. It can be noted that a certain fraction of reduced protein remained upon  $H_2O_2$  or GSSG treatments, which is not observed with GSNO (Figure 2A). Overall, this indicates that at these concentrations and excess, the oxidation of *AtGRXS15* monomers is not that efficient which allows dimerization. Whatever the oxidant used, dimer formation should thus be the result of a nucleophilic attack of a thiolate group from a reduced monomer on either a sulfenic acid, or a glutathionylated or nitrosylated cysteine.



**Figure 2.** Sensibility of *AtGRXS15* towards oxidants. Pre-reduced recombinant *AtGRXS15* (13  $\mu$ M) was incubated with a 5- to 10-fold molar excess of  $H_2O_2$ ,  $DTT_{ox}$ , GSSG, and GSNO for 2 h at RT. Remaining reduced thiols were then alkylated before protein migration on non-reducing SDS-PAGE. The numbers on the right correspond to the number of thiols that remained reduced upon treatment and thus were alkylated. A gel representative of at least three independent experiments is shown here (A). In another series of experiments, pre-reduced recombinant *AtGRXS15* (5  $\mu$ M) was incubated for 1 h at RT with  $H_2O_2$ , GSSG, and GSNO at concentrations ranging from 50  $\mu$ M to 10 mM. The remaining free thiols were alkylated with mBBR and quantified through measurement of the resulting fluorescence. The decrease of fluorescence, represented as a percentage of oxidized thiol, was plotted against the oxidant concentration for determination of  $S_{0.5}$  value (B). Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

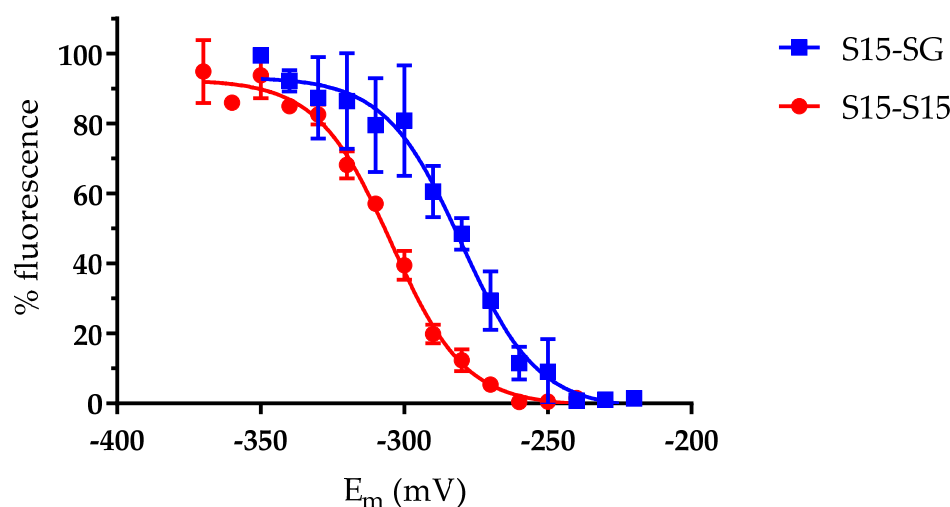
Further experiments were performed to obtain more quantitative data about *AtGRXS15* oxidation. Reduced *AtGRXS15* was incubated for 1 h in the presence of increasing concentrations of oxidants and then reacted with mBBR, a fluorescent alkylating reagent specific of thiol groups. The observed decrease of fluorescence, which reflects an increase of *AtGRXS15* oxidation, is represented as a percentage of thiol oxidation that was plotted as a function of oxidant concentration (Figure 2B). This allowed us to calculate  $S_{0.5}$  values that correspond to the concentrations of oxidant necessary to reach half-maximal protein oxidation. These  $S_{0.5}$  values are of  $72 \pm 10$   $\mu$ M for  $H_2O_2$ ,  $154 \pm 14$   $\mu$ M for GSSG, and  $21 \pm 1$   $\mu$ M for GSNO, indicating that *AtGRXS15* is more sensitive to GSNO than to  $H_2O_2$  and to GSSG. In comparison with similar studies performed with *AtGRXS16*, *AtGRXS15* appears more susceptible to  $H_2O_2$ , approximately as sensitive to GSNO, and less susceptible to GSSG [15]. The major difference is that *AtGRXS16* possesses an additional semi-conserved cysteine in the C-terminal region, which leads to the formation of an oxidized form with an intramolecular disulfide bridge. This may also account for the better efficiency of *AtGRXS16* in catalyzing the GSSG-dependent oxidation of roGFP2 [14,15,19]. Similarly, the presence of an additional cysteine in the C-terminal part of other class II GRXs, *EcGrx4* [16], *ScGrx5* [20], and *CrGRX3* [17] for instance, also leads to the formation of an intramolecular disulfide bridge. All these results suggested that the presence of the C-terminal cysteine prevents the covalent dimerization. However, dimerization of *C. reinhardtii* GRX5 and GRX6, two class II GRXs, was observed upon  $DTT_{ox}$  treatment [36] and in the case of *CrGRX5*, the C-terminal cysteine is present, indicating that there might be other determinants controlling dimerization.

### 3.3. The *AtGRXS15* Intermolecular Disulfide Bonds Have Low Redox Potentials

In vitro oxidation experiments suggested that two thiol/disulfide couples could be considered for *AtGRXS15*, one for the intermolecular disulfide bridge formed upon *AtGRXS15* dimerization ( $2R-S^-/R-SS-R$ ) and one for a glutathionylated monomer ( $R-S^-/R-SSG$ ) because both GSSG and GSNO could oxidize *AtGRXS15*. While we aimed at identifying



potential differences in the redox properties of both oxidized forms, by determining their redox midpoint potentials ( $E_m$ ), glutathionylation by GSSG and GSNO was not complete. Hence, we applied a treatment combining  $H_2O_2$  and GSH, which was previously reported to induce glutathionylation of *A. thaliana* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (AtGAPDH) for instance [37]. Incidentally, in a physiological context, the sulfenic acid would preferentially be attacked by GSH rather than by another reduced AtGRXS15. Indeed, this treatment proved to work well since a single oxidized monomeric species that is reduced in the presence of reductants was obtained. Titration experiments using both types of pre-oxidized proteins incubated in various mixtures of DTT<sub>red</sub>/DTT<sub>ox</sub> demonstrated low  $E_m$  values of  $-280 \pm 2$  mV and  $-304 \pm 1$  mV at pH 7.0 for the glutathionylated monomer and disulfide-bridged dimer, respectively (Figure 3).



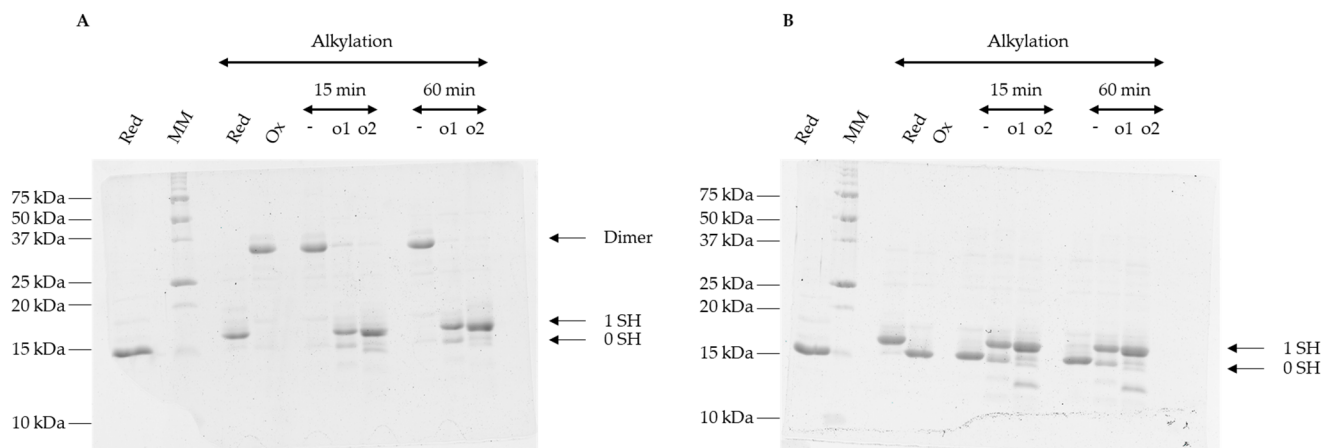
**Figure 3.** Redox midpoint potentials of glutathionylated and disulfide-bridged forms of AtGRXS15. After incubation of pre-oxidized recombinant AtGRXS15 (10  $\mu$ M) forms (either glutathionylated monomer or oxidized dimer) in mixtures of DTT<sub>red</sub>/DTT<sub>ox</sub> with defined redox potentials, reduced thiols were labelled with mBBr. Fluorescence emission corresponding to mBBr-labelled thiols was then transformed to a % fluorescence (relatively to the minimum and maximum values obtained), which was plotted against the respective redox potentials. Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

Several oxidized GRX forms have been previously described either for class I or class II GRXs and  $E_m$  values reported in some cases. Concerning the redox potential of the glutathione adduct, it has been shown to oscillate from  $-242$  mV to  $-254$  mV at pH 7.0 for dithiol poplar class I GRXs [5] and even to reach  $-315$  mV at pH 7.0 for poplar GRXS12, an atypical monothiol class I GRX [35]. The value obtained for the class II AtGRXS15 ( $-280$  mV) is situated in the middle. In fact, most class II GRXs possess the C-terminal semi-conserved cysteine which forms intramolecular disulfide bonds with the active site cysteine of the CGFS motif. The redox potentials for these intramolecular disulfides range from  $-175$  mV at pH 7.0 for ScGrx5 [20] to  $-323$  mV at pH 7.9 (which translates into  $-269$  mV at pH 7.0) for CrGRX3 and to  $-296$  mV at pH 7.0 for AtGRXS16 [15,17]. To the best of our knowledge, the formation of an intermolecular disulfide involving the active site cysteine of class II GRXs has not been reported so far, which prevents comparison of the redox potentials. The only information is that an intermolecular disulfide bond formed on homodimeric poplar GRXC1 and GRXC2 and involving the semi-conserved C-terminal cysteine of two monomers can be reduced by GSH [5].

### 3.4. Oxidized Forms of GRXS15 Are Reduced by Mitochondrial Reduction Systems

The low redox midpoint potential values of the disulfide bonds formed on glutathionylated and dimeric AtGRXS15 led us to evaluate the capacity of GSH or mitochondrial TRXs

to reduce these species. As demonstrated by the appearance of a band at 17 kDa corresponding to the reduced *At*GRXS15 monomer, both mitochondrial thioredoxins o (*At*TRXo1 and *At*TRXo2) had the ability to reduce *At*GRXS15 homodimers and glutathionylated monomers (Figure 4A,B).



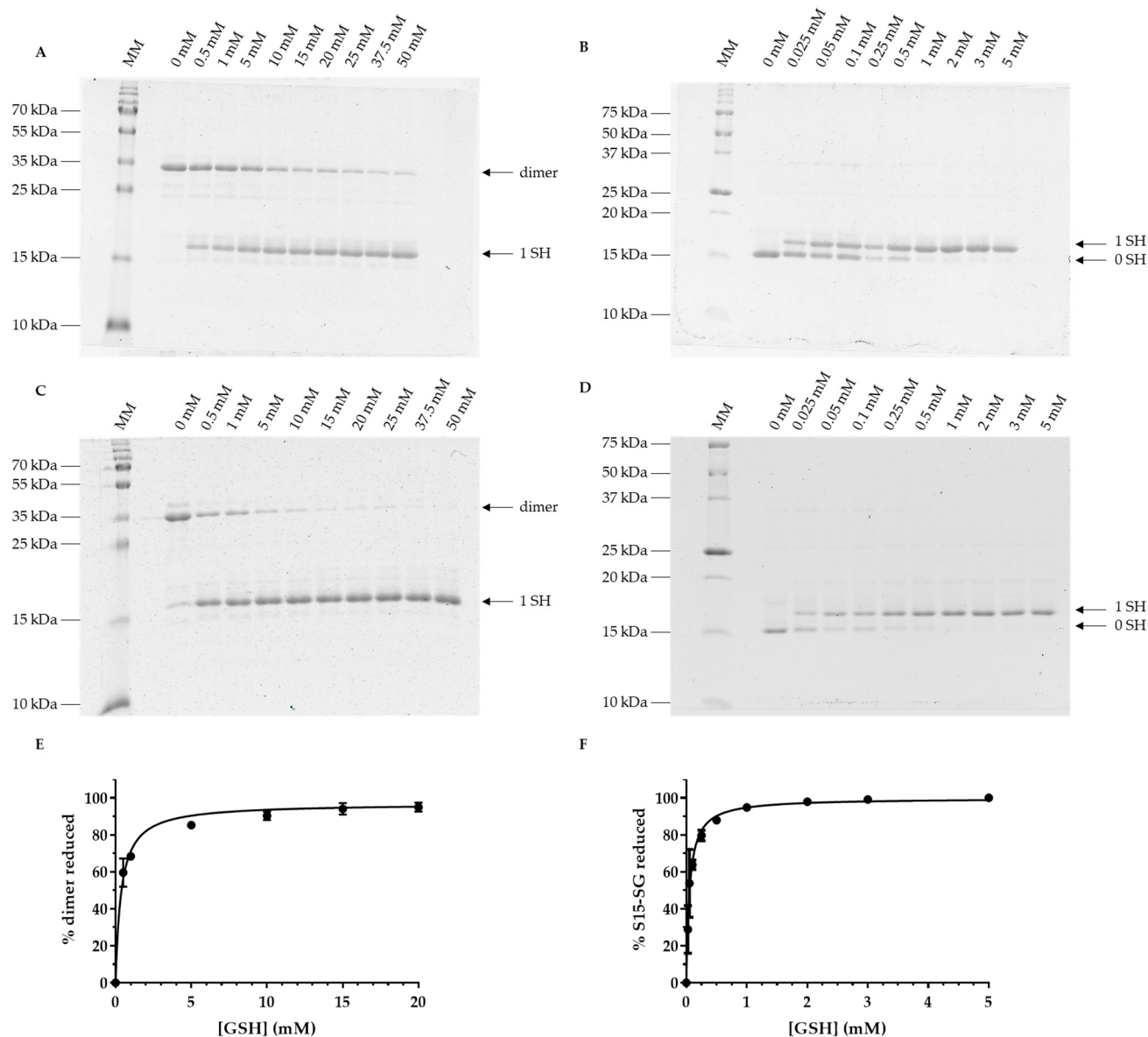
**Figure 4.** Reduction of oxidized *At*GRXS15 forms by mitochondrial thioredoxins. Pre-oxidized recombinant *At*GRXS15 (13  $\mu$ M), either dimeric (A) or glutathionylated (B), was incubated with the reconstituted mitochondrial TRX system (*At*TRX o1 or o2, *At*NTRB, NADPH) for 15 or 60 min. Remaining reduced thiols were then alkylated before sample migration on non-reducing SDS-PAGE. The numbers on the right correspond to the number of thiols that remained reduced upon treatment and thus were alkylated. Gels are representative of at least three independent experiments.

In the same conditions (15 min reaction), GSH was not able to fully reduce the dimeric form of *At*GRXS15 (Figure 5A). Only after 1 h of incubation, GSH was able to reduce the dimeric *At*GRXS15, with 90% reduction being achieved with 10 mM GSH (Figure 5C,E). In fact,  $367 \pm 30 \mu$ M of GSH was needed to reduce 50% of dimeric *At*GRXS15 (Figure 5C). Concerning glutathionylated *At*GRXS15, 50% reduction was achieved with  $54 \pm 5 \mu$ M of GSH in 1 h (Figure 5D) and with approximately 100  $\mu$ M in 15 min (Figure 5B). In both reaction times, 90% reduction was reached with approximately 1 mM GSH (Figure 5B,F).

These results are interesting in several respects. Indeed, previous studies suggested that class II GRXs lack a GSH activator site, meaning that GSH was not able to perform the reductive half-reaction, in other words, the reduction of the glutathionylated cysteine. However, the data shown here indicate that GSH concentrations below physiological levels can efficiently reduce glutathionylated *At*GRXS15. On the contrary, GSH is less efficient for the reduction of an oxidized dimeric *At*GRXS15. Part of the reason may be the lower redox potential of the intermolecular disulfide bridge.

The second interesting observation is that both mitochondrial TRXs o from *A. thaliana* are able to reduce both oxidized forms of *At*GRXS15, with an efficiency that appears better than the one of GSH. Such a difference was already reported for yeast Grx5, but in this case, TRXs reduced an intramolecular disulfide bridge formed between the active site cysteine and the semi-conserved C-terminal cysteine, the redox potential of which is much less negative (i.e.,  $-175$  mV) [20]. In fact, even though a few TRXs were reported to catalyze deglutathionylation reactions, they are present in different compartments and from different sources, yeast, microalga, plant, plathelminths, or mice [37–41].

Finally, these in vitro results may have another implication. Indeed, because *At*GRXS15 is the only GRX reported in plant mitochondria but is unable to reduce roGFP2 in vitro using GSH, it is surprising that a mitochondrially-expressed roGFP2 is reduced [26,27]. Hence, from our results, we might hypothesize that *At*TRXs o contribute to the recycling of glutathionylated *At*GRXS15 in cellulo, thus allowing to maintain roGFP2 reduced.



**Figure 5.** Reduction of oxidized *AtGRXS15* forms by GSH. Pre-oxidized recombinant *AtGRXS15* (13  $\mu$ M), either dimeric (A,C) or glutathionylated (B,D), was incubated with 25  $\mu$ M to 50 mM of GSH for 15 min (A,B) or 60 min at RT (C,D). Remaining reduced thiols were then alkylated before sample migration on non-reducing SDS-PAGE. The numbers on the right correspond to the number of thiols that were reduced upon treatment and thus were alkylated. Because the redox equilibrium between oxidized *AtGRXS15* and GSH was only complete for 60 min of incubation, gel bands were quantified for dimeric (E) and glutathionylated (F) *AtGRXS15* only at this time-point. The normalized intensities were transformed into % oxidized forms reduced respective to the minimum and maximum obtained and those values were plotted against GSH concentration. Gels are representative of at least three independent experiments and thus quantification represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

#### 4. Conclusions

In this study, we investigated the redox properties of *AtGRXS15*. We observed that, despite the sole cysteine residue has an acidic pKa as in other class I or II GRXs, the oxidized states formed in vitro upon GSNO,  $H_2O_2$ , and GSSG treatments are different because of the absence of the semi-conserved C-terminal cysteine. Two oxidation forms with quite electronegative redox midpoint potentials, *AtGRXS15* homodimers and glutathionylated

monomers, are formed and reduced by GSH and mitochondrial *At*TRXs, albeit not with the same efficiency. Interestingly, we observed that mitochondrial TRXs from *Arabidopsis* possess de-glutathionylation activity as reported already for cytosolic *At*TRXh [37]. Hence, the combined presence of *At*GRXS15 and *At*TRXs may account for the reduction of a mitochondrion-expressed roGFP2 but also possibly other glutathionylated target proteins. In conclusion, given the potential oxidative environment existing in mitochondria, *At*GRXS15 may become transiently oxidized, which may actually slow down Fe-S cluster insertion in some proteins during adverse conditions. The reduction of these reversible oxidation forms would allow the rapid recovery of the capacity to bind an Fe-S cluster and promote the maturation of Fe-S proteins, including those present in the respiratory chain complexes and in lipoate synthase [42].

**Author Contributions:** Conceptualization, L.C., J.C., N.R.; methodology, L.C., J.C.; formal analysis, L.C., J.C.; data curation, L.C., J.C., N.R.; writing—original draft preparation, L.C.; writing—review and editing, J.C., N.R.; supervision, J.C., N.R.; project administration, N.R.; funding acquisition, N.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the French National Research Agency (ANR-18-CE92-0016-01). The UMR1136 is supported by a grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the Investissements d’Avenir program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All data are included in the article.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Andreas J. Meyer, Luca Pedroletti and Anna Moseler (Univ. Of Bonn, Germany) for discussion.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

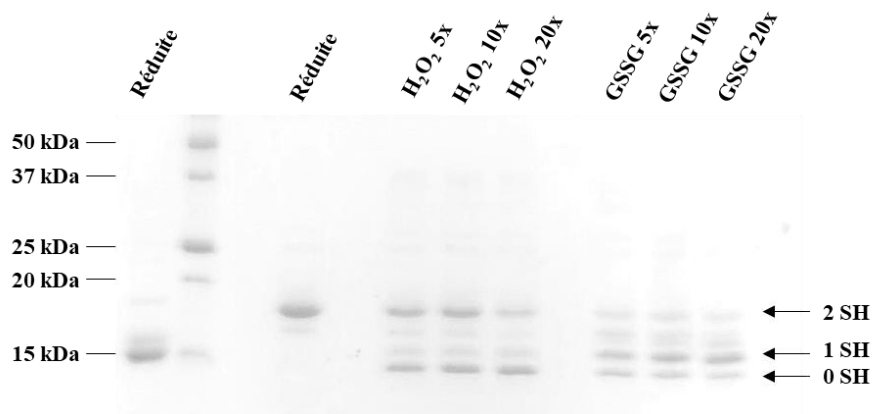
1. Alves, R.; Vilaprinyo, E.; Sorribas, A.; Herrero, E. Evolution based on domain combinations: The case of glutaredoxins. *BMC Evol. Biol.* **2009**, *9*, 66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Martin, J.L. Thioredoxin—A fold for all reasons. *Structure* **1995**, *3*, 245–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Couturier, J.; Jacquot, J.-P.; Rouhier, N. Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 2539–2557. [[CrossRef](#)]
4. Lillig, C.H.; Berndt, C. Glutaredoxins in Thiol/Disulfide Exchange. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 1654–1665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Couturier, J.; Jacquot, J.-P.; Rouhier, N. Toward a refined classification of class I dithiol glutaredoxins from poplar: Biochemical basis for the definition of two subclasses. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Rouhier, N.; Lemaire, S.D.; Jacquot, J.-P. The Role of Glutathione in Photosynthetic Organisms: Emerging Functions for Glutaredoxins and Glutathionylation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 143–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Zaffagnini, M.; Bedhomme, M.; Lemaire, S.D.; Trost, P. The emerging roles of protein glutathionylation in chloroplasts. *Plant Sci.* **2012**, *185–186*, 86–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Zaffagnini, M.; Fermani, S.; Marchand, C.H.; Costa, A.; Sparla, F.; Rouhier, N.; Geigenberger, P.; Lemaire, S.D.; Trost, P. Redox Homeostasis in Photosynthetic Organisms: Novel and Established Thiol-Based Molecular Mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.* **2019**, *31*, 155–210. [[CrossRef](#)]
9. Couturier, J.; Ströher, E.; Albetel, A.-N.; Roret, T.; Muthuramalingam, M.; Tarrago, L.; Seidel, T.; Tsan, P.; Jacquot, J.-P.; Johnson, M.K.; et al. *Arabidopsis* Chloroplastic Glutaredoxin C5 as a Model to Explore Molecular Determinants for Iron-Sulfur Cluster Binding into Glutaredoxins. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 27515–27527. [[CrossRef](#)]
10. Rouhier, N.; Unno, H.; Bandyopadhyay, S.; Masip, L.; Kim, S.-K.; Hirasawa, M.; Gualberto, J.M.; Lattard, V.; Kusunoki, M.; Knaff, D.B.; et al. Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe–2S] cluster in poplar glutaredoxin C1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7379–7384. [[CrossRef](#)]
11. Johansson, C.; Kavanagh, K.L.; Gileadi, O.; Oppermann, U. Reversible Sequestration of Active Site Cysteines in a 2Fe-2S-bridged Dimer Provides a Mechanism for Glutaredoxin 2 Regulation in Human Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 3077–3082. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Berndt, C.; Christ, L.; Rouhier, N.; Mühlhoff, U. Glutaredoxins with iron-sulphur clusters in eukaryotes—Structure, function and impact on disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Bioenerg.* **2021**, *1862*, 148317. [[CrossRef](#)]
13. Zimmermann, J.; Oestreicher, J.; Hess, S.; Herrmann, J.M.; Deponte, M.; Morgan, B. One cysteine is enough: A monothiol Grx can functionally replace all cytosolic Trx and dithiol Grx. *Redox Biol.* **2020**, *36*, 101598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Begas, P.; Liedgens, L.; Moseler, A.; Meyer, A.J.; Deponte, M. Glutaredoxin catalysis requires two distinct glutathione interaction sites. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Zannini, F.; Moseler, A.; Bchini, R.; Dhalleine, T.; Meyer, A.J.; Rouhier, N.; Couturier, J. The thioredoxin-mediated recycling of *Arabidopsis thaliana* GRXS16 relies on a conserved C-terminal cysteine. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* **2019**, *1863*, 426–436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Fernandes, A.P.; Fladvad, M.; Berndt, C.; Andréen, C.; Lillig, C.H.; Neubauer, P.; Sunnerhagen, M.; Holmgren, A.; Vlamis-Gardikas, A. A Novel Monothiol Glutaredoxin (Grx4) from *Escherichia coli* Can Serve as a Substrate for Thioredoxin Reductase. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 24544–24552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Zaffagnini, M.; Michelet, L.; Massot, V.; Trost, P.; Lemaire, S.D. Biochemical Characterization of Glutaredoxins from *Chlamydomonas reinhardtii* Reveals the Unique Properties of a Chloroplastic CGFS-type Glutaredoxin. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 8868–8876. [[CrossRef](#)]
18. Johansson, C.; Lillig, C.H.; Holmgren, A. Human Mitochondrial Glutaredoxin Reduces S-Glutathionylated Proteins with High Affinity Accepting Electrons from Either Glutathione or Thioredoxin Reductase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 7537–7543. [[CrossRef](#)]
19. Moseler, A.; Aller, L.; Wagner, S.; Nietzel, T.; Przybyla-Toscano, J.; Mühlhoff, U.; Lill, R.; Berndt, C.; Rouhier, N.; Schwarzländer, M.; et al. The mitochondrial monothiol glutaredoxin S15 is essential for iron-sulfur protein maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 13735–13740. [[CrossRef](#)]
20. Tamarit, J.; Bellí, G.; Cabisco, E.; Herrero, E.; Ros, J. Biochemical Characterization of Yeast Mitochondrial Grx5 Monothiol Glutaredoxin. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 25745–25751. [[CrossRef](#)]
21. Liedgens, L.; Zimmermann, J.; Wäschenbach, L.; Geissel, F.; Laporte, H.; Gohlke, H.; Morgan, B.; Deponte, M. Quantitative assessment of the determinant structural differences between redox-active and inactive glutaredoxins. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Trnka, D.; Engelke, A.D.; Gellert, M.; Moseler, A.; Hossain, M.F.; Lindenberg, T.T.; Pedroletti, L.; Odermatt, B.; de Souza, J.V.; Bronowska, A.K.; et al. Molecular basis for the distinct functions of redox-active and FeS-transferring glutaredoxins. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Przybyla-Toscano, J.; Christ, L.; Keech, O.; Rouhier, N. Iron-sulfur proteins in plant mitochondria: Roles and maturation. *J. Exp. Bot.* **2021**, *72*, 2014–2044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Azam, T.; Przybyla-Toscano, J.; Vignols, F.; Couturier, J.; Rouhier, N.; Johnson, M.K. The Arabidopsis Mitochondrial Glutaredoxin GRXS15 Provides [2Fe-2S] Clusters for ISCA-Mediated [4Fe-4S] Cluster Maturation. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9237. [[CrossRef](#)]
25. Ströher, E.; Grassl, J.; Carrie, C.; Fenske, R.; Whelan, J.; Millar, A.H. Glutaredoxin S15 Is Involved in Fe-S Cluster Transfer in Mitochondria Influencing Lipic Acid-Dependent Enzymes, Plant Growth, and Arsenic Tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2016**, *170*, 1284–1299. [[CrossRef](#)]
26. Schwarzländer, M.; Fricker, M.D.; Sweetlove, L.J. Monitoring the in vivo redox state of plant mitochondria: Effect of respiratory inhibitors, abiotic stress and assessment of recovery from oxidative challenge. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1787*, 468–475. [[CrossRef](#)]
27. Schwarzländer, M.; Fricker, M.D.; Müller, C.; Marty, L.; Brach, T.; Novak, J.; Sweetlove, L.J.; Hell, R.; Meyer, A.J. Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *J. Microsc.* **2008**, *231*, 299–316. [[CrossRef](#)]
28. Zhang, B.; Bandyopadhyay, S.; Shakamuri, P.; Naik, S.G.; Huynh, B.H.; Couturier, J.; Rouhier, N.; Johnson, M.K. Monothiol glutaredoxins can bind linear [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]<sup>+</sup> and [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]<sup>2+</sup> clusters in addition to [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> clusters: Spectroscopic characterization and functional implications. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15153–15164. [[CrossRef](#)]
29. Nietzel, T.; Mostertz, J.; Ruberti, C.; Née, G.; Fuchs, P.; Wagner, S.; Moseler, A.; Müller-Schüssele, S.J.; Benamar, A.; Poschet, G.; et al. Redox-mediated kick-start of mitochondrial energy metabolism drives resource-efficient seed germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 741–751. [[CrossRef](#)]
30. Schenk, P.M.; Baumann, S.; Mattes, R.; Steinbiss, H.H. Improved high-level expression system for eukaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA polymerase and rare Arg<sup>t</sup>RNAs. *BioTechniques* **1995**, *19*, 196–198, 200.
31. Zannini, F.; Roret, T.; Przybyla-Toscano, J.; Dhalleine, T.; Rouhier, N.; Couturier, J. Mitochondrial *Arabidopsis thaliana* TRXo Isoforms Bind an Iron-Sulfur Cluster and Reduce NFU Proteins In Vitro. *Antioxidants* **2018**, *7*, 142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Jacquot, J.-P.; Rivera-Madrid, R.; Marinho, P.; Kollarova, M.; Le Maréchal, P.; Miginiac-Maslow, M.; Meyer, Y. Arabidopsis thaliana NADPH Thioredoxin Reductase. *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 1357–1363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Zannini, F.; Couturier, J.; Keech, O.; Rouhier, N. In Vitro Alkylation Methods for Assessing the Protein Redox State. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2017**, *1653*, 51–64. [[CrossRef](#)]
34. Couturier, J.; Koh, C.S.; Zaffagnini, M.; Winger, A.M.; Gualberto, J.M.; Corbier, C.; Decottignies, P.; Jacquot, J.-P.; Lemaire, S.D.; Didierjean, C.; et al. Structure-Function Relationship of the Chloroplastic Glutaredoxin S12 with an Atypical WCSYS Active Site. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 9299–9310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zaffagnini, M.; Bedhomme, M.; Marchand, C.H.; Couturier, J.; Gao, X.-H.; Rouhier, N.; Trost, P.; Lemaire, S.D. Glutaredoxin S12: Unique Properties for Redox Signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **2012**, *16*, 17–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Gao, X.-H.; Zaffagnini, M.; Bedhomme, M.; Michelet, L.; Cassier-Chauvat, C.; Decottignies, P.; Lemaire, S.D. Biochemical characterization of glutaredoxins from *Chlamydomonas reinhardtii*: Kinetics and specificity in deglutathionylation reactions. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 2242–2248. [[CrossRef](#)]
37. Bedhomme, M.; Adamo, M.; Marchand, C.H.; Couturier, J.; Rouhier, N.; Lemaire, S.D.; Zaffagnini, M.; Trost, P. Glutathionylation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the model plant *Arabidopsis thaliana* is reversed by both glutaredoxins and thioredoxins in vitro. *Biochem. J.* **2012**, *445*, 337–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Greetham, D.; Vickerstaff, J.; Shenton, D.; Perrone, G.G.; Dawes, I.W.; Grant, C.M. Thioredoxins function as deglutathionylase enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Biochem.* **2010**, *11*, 3. [[CrossRef](#)]
39. Kehr, S.; Jortzik, E.; Delahunty, C.; Yates, J.R.; Rahlfs, S.; Becker, K. Protein S-glutathionylation in malaria parasites. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15*, 2855–2865. [[CrossRef](#)]
40. Bonilla, M.; Denicola, A.; Marino, S.M.; Gladyshev, V.N.; Salinas, G. Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminth parasites: Alternative pathways for glutathione reduction and deglutathionylation. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 4959–4967. [[CrossRef](#)]
41. Subramani, J.; Kundumani-Sridharan, V.; Hilgers, R.H.P.; Owens, C.; Das, K.C. Thioredoxin Uses a GSH-independent Route to Deglutathionylate Endothelial Nitric-oxide Synthase and Protect against Myocardial Infarction. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 23374–23389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Moseler, A.; Kruse, I.; Maclean, A.E.; Pedroletti, L.; Franceschetti, M.; Wagner, S.; Wehler, R.; Fischer-Schrader, K.; Poschet, G.; Wirtz, M.; et al. The function of glutaredoxin GRXS15 is required for lipoyl-dependent dehydrogenases in mitochondria. *Plant Physiol.* **2021**, *186*, 1507–1525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

La plupart des GRX de classe II, et notamment les orthologues Grx5 et GLRX5 respectivement présents chez la levure et l'homme, possèdent une cystéine dans la région C-terminale de la protéine. De plus, un pont disulfure intramoléculaire est formé dans plusieurs glutarédoxines de classe II telles qu'AtGRXS16, EcGrx4, ScGrx5 ou encore CrGRX3 en réponse à un traitement oxydant. Il est intéressant de noter que cette cystéine est aussi partiellement conservée dans les GRX de classe I et III. Nous nous sommes donc demandé si l'ajout d'une seconde cystéine au sein de la séquence de GRXS15 pouvait modifier son comportement vis-à-vis des traitements oxydants testés. La séquence codante de GRXS15 a donc été modifiée par mutagenèse dirigée afin de substituer la sérine en position 145 par une cystéine (variant GRXS15<sup>S145C</sup>). La protéine recombinante purifiée a été pré-réduite en présence de TCEP, puis incubée en présence de différents excès d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de GSSG. Les cystéines réduites restantes ont été alkylées par du mPEG<sub>24</sub>, induisant une augmentation de la masse moléculaire de la protéine de 1,2 kDa par cystéine alkylée (figure 33).



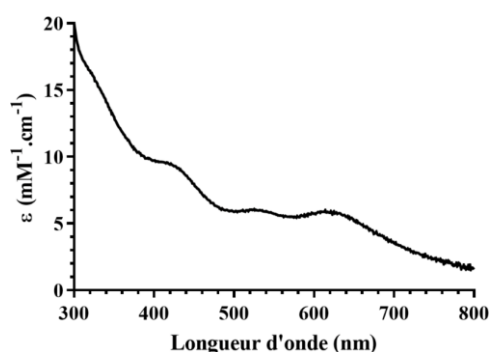
**Figure 33. Sensibilité d'AtGRXS15<sup>S145C</sup> aux traitements oxydants**

Le variant GRXS15<sup>S145C</sup> pré-réduit (13 μM) a été incubé avec un excès molaire de 5 à 20 fois d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou de GSSG pendant 2 h à température ambiante. Les groupements thiols réduits restants ont ensuite été alkylés avec du mPEG<sub>24</sub> et les échantillons ont été soumis à une migration sur SDS-PAGE non réducteur. Les chiffres à droite correspondent au nombre de groupements thiols résiduels.

Après alkylation, la protéine réduite présente une augmentation de sa masse moléculaire d'environ 2 – 3 kDa correspondant à l'alkylation des deux groupements thiols présents sur la protéine par le mPEG<sub>24</sub>. Le traitement de la protéine avec des concentrations croissantes en l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induit une oxydation progressive mais incomplète des deux groupements thiols dans ces conditions. En absence de forme dimérique covalente, ces résultats suggèrent donc la formation d'un pont disulfure intramoléculaire entre les deux cystéines. Ce résultat est donc différent de la formation du dimère invariablement observé avec GRXS15 non mutée. Une partie des protéines de l'échantillon présente une augmentation de masse intermédiaire, suggérant soit l'existence d'un acide sulfénique soit d'une forme d'oxydation supérieure, acide sulfinique ou sulfonique. Dans le cas d'un traitement de la protéine au GSSG, le profil d'oxydation est différent, puisque l'oxydation est plus efficace à des excès inférieurs en

espèce oxydante et la fraction protéique présentant une oxydation partielle est majoritaire, par rapport à la fraction totalement oxydée. Ainsi, nous concluons que GRXS15 est glutathionylée assez efficacement par le GSSG mais que la seconde cystéine ne semble pas réagir efficacement avec cet adduit GSH. Il est d'ailleurs possible que la fraction totalement oxydée corresponde à une forme avec un pont disulfure intramoléculaire ou à une forme di-glutathionylée. La première hypothèse, plus vraisemblable, pourra être validée par une analyse en spectrométrie de masse.

Cette observation nous renseigne cependant sur la proximité structurale des cystéines impliquées dans la formation de ce pont disulfure, cela nous a donc mené à tester si cette proximité pourrait également permettre la liaison d'un centre Fe-S par le variant GRXS15<sup>S145C</sup> en absence de GSH tel que cela a été observé pour la protéine de levure ScGRX5 (Zhang *et al.*, 2013). Pour cela, des conditions similaires à celles employées pour la reconstitution de GRXS15 non mutée (section III.2.) ont été appliquées, à la différence de l'absence de GSH dans le mélange réactionnel ainsi que l'utilisation d'un excès 3-fois en fer et en soufre en relation avec la stœchiométrie du complexe [4Fe-4S]:GRXS15<sup>S145C</sup><sub>2</sub> hypothétique.



**Figure 34. Spectre d'absorption UV-visible d'holo-GRXS15<sup>S145C</sup>**

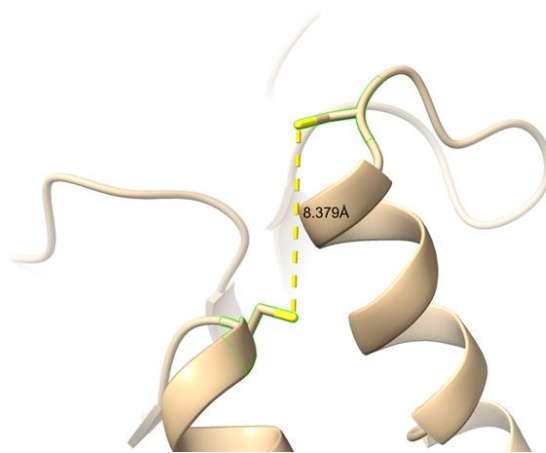
Le spectre d'absorption UV-visible d'holo-GRXS15 obtenu après reconstitution chimique en présence d'un excès 3-fois en fer et en soufre a été mesuré et les valeurs obtenues ont été transformées en coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) du dimère en se basant sur la concentration protéique de l'échantillon déterminée par la méthode BCA.

Après élimination du fer et du soufre excédentaires, le spectre d'absorption UV-visible de l'échantillon est mesuré entre 260 et 800 nm. L'allure et les longueurs d'ondes des bandes d'absorption comprises dans la région 300 – 500 nm sont similaires à celles obtenues après la reconstitution de la protéine ScGRX5 en absence de GSH ou après reconstitution de la protéine NFU en absence de DTT (Azam *et al.*, 2020b; Zhang *et al.*, 2013). Cependant, la présence de bandes d'absorption à 530 et 615 nm suggère la liaison de centres [3Fe-4S] linéaires et/ou de fer lié à la protéine (figure 34). Ces résultats semblent donc indiquer une hétérogénéité du mélange obtenu. Les quantifications indiquent la présence 2,4 atomes de fer et 2 atomes de soufre par monomère, et permettent difficilement de conclure sur la nature et la proportion des différentes formes de centre Fe-S ou de fer liés. Des expériences de spectroscopie Mössbauer seraient par exemple nécessaires pour clarifier ce point. L'absence de donneur d'électrons potentiel au sein du mélange réactionnel aurait en effet pu limiter la réduction du fer ferrique



en fer ferreux nécessaire à l'assemblage d'un centre  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ , menant ainsi à l'obtention d'un mélange hétérogène. En effet, bien qu'aucune différence n'ait été observée lors de la reconstitution de ScGrx5 entre les conditions comportant ou non du DTT, la méthode utilisée (*ie* reconstitution semi-enzymatique) implique la présence d'un excès important de cystéine (20-fois) (Zhang *et al.*, 2013). La présence de cette concentration importante en cystéine couplée à un temps d'incubation relativement long (2,5 h) auraient ainsi pu permettre la réduction de l'atome de fer *via* l'oxydation de la cystéine en cystine, permettant ainsi l'obtention d'un mélange homogène comportant uniquement des centres  $[4\text{Fe-4S}]$ .

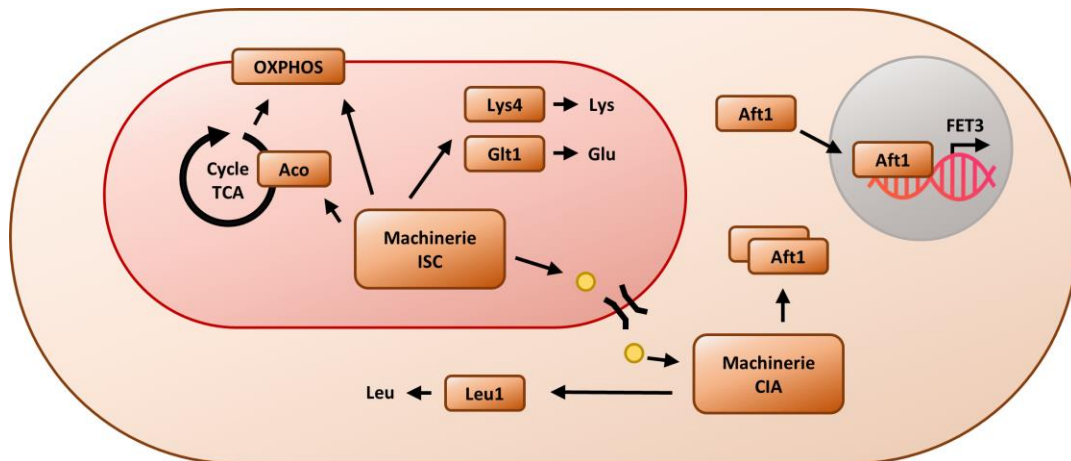
En conclusion, la présence d'une seconde cystéine dans la partie C-terminale de la protéine permettrait bien la formation d'un pont disulfure intramoléculaire en réponse à un traitement oxydant. Cette forme d'oxydation pourrait être, pour les GRX possédant cette cystéine, une forme additionnelle de protection contre la suroxydation empêchant en effet la formation d'acide sulfinique ou sulfonique lors de conditions oxydantes. De plus, bien que la reconstitution de centre Fe-S *in vitro* de GRXS15<sup>S145C</sup> n'ait pas mené à l'obtention d'un échantillon homogène, cette expérience démontre que la présence d'une seconde cystéine en position C-terminale de la protéine permet la fixation d'un centre Fe-S en absence de GSH par le variant GRXS15<sup>S145C</sup> de manière similaire à ce qui a été observé pour ScGrx5 (Azam *et al.*, 2020a; Zhang *et al.*, 2013). La prédiction de structure de ce variant indique que la distance entre les deux cystéines pourrait en effet permettre la fixation du centre Fe-S (figure 35).



**Figure 35. Distance séparant les deux cystéines sur le modèle structural prédit du variant GRXS15<sup>S145C</sup>**  
Le modèle de GRXS15<sup>S145C</sup> (résidus 60-169) est représenté en beige, ses deux cystéines sont représentées en jaune. La prédiction de la structure tridimensionnelle de la protéine a été obtenue grâce à l'algorithme « AlphaFold2 » (Evans *et al.*, 2021).

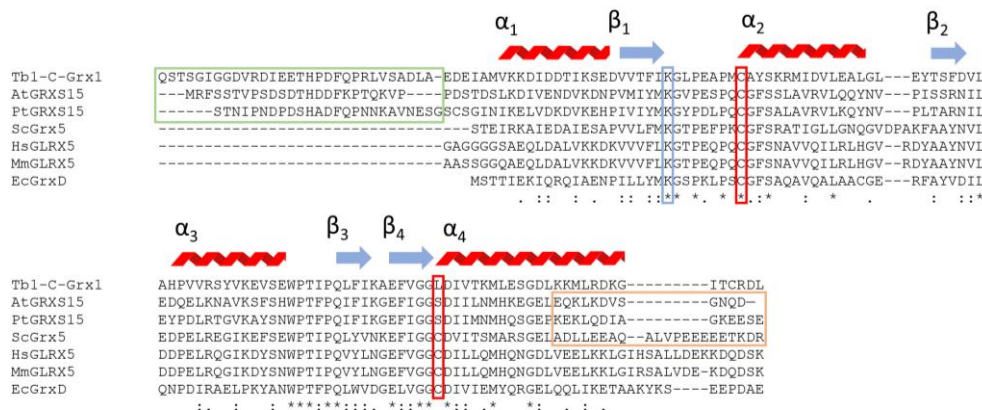
### Chapitre 3 : Complémentation fonctionnelle du mutant de levure *grx5*

L'absence de la protéine Grx5, homologue de GRXS15, chez la levure provoque une perturbation du métabolisme respiratoire, un défaut de croissance sur milieu minimum, une accumulation de fer et une sensibilité exacerbée à des molécules oxydantes telles que des peroxydes ou le diamide (Molina-Navarro *et al.*, 2006; Rodríguez-Manzanares *et al.*, 1999, 2002). Ces phénotypes ont été reliés à l'implication de Grx5 dans la machinerie d'assemblage des centres Fe-S mitochondriale. Ainsi, la perturbation du métabolisme respiratoire a été imputée à un défaut d'incorporation des centres Fe-S au sein des protéines de la chaîne de transport d'électrons. Le défaut de croissance sur milieu minimum est quant à lui dû à l'auxotrophie du mutant *grx5* pour la lysine, le glutamate et la leucine. La synthèse de ces trois acides aminés nécessite en effet l'implication de protéines à centre Fe-S, respectivement l'homo-aconitase (Lys4), la glutamate synthase (Glt1) et l'isopropylmalate isomérase (Leu1) dont la maturation serait affectée en l'absence de Grx5. Lys4 et Glt1 sont des protéines mitochondriales dont la maturation est directement dépendante de la machinerie ISC, Leu1 en revanche est présente dans le cytosol et donc dépendante de la machinerie d'assemblage des centres Fe-S cytosolique (CIA). De la même manière que chez les plantes, le fonctionnement de la machinerie CIA dépend de l'apport d'un composé soufré non identifié provenant de la machinerie ISC permettant ainsi d'expliquer l'auxotrophie à la leucine observée chez le mutant *grx5*. Une autre protéine dépendant de la machinerie CIA pour sa maturation est le facteur de transcription Aft1. Sous son holo-forme, Aft1 est localisée dans le cytosol et inactive, en revanche sous son apo-forme, elle est transloquée dans le noyau où elle induit l'expression de gènes impliqués dans l'acquisition du fer. Dans le cas du mutant *grx5*, la perturbation du fonctionnement de la machinerie CIA entraîne donc une accumulation de l'apo-forme d'Aft1 induisant une accumulation de fer. Cette accumulation de fer, conjointement à un défaut de son incorporation au sein des protéines Fe-S, provoque un stress oxydant dans les cellules *via* les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss à l'origine de la sensibilité accrue du mutant *grx5* aux agents oxydants (figure 36).



**Figure 36. Schéma récapitulatif des voies métaboliques impactées chez le mutant de levure *grx5***

Des travaux menés sur les GRX de classe II de peuplier ont démontré que l'expression de PtGRXS15 au sein de la souche *grx5* ne permet pas la restauration du phénotype sauvage (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). Dans ces expériences, les GRX étaient exprimées avec une étiquette 3xHA à l'extrémité C-terminale, sous le contrôle d'un promoteur inducible par la doxycycline et la construction intégrée au chromosome. De même, une absence partielle de complémentation était retrouvée dans une autre série d'expériences où l'isoforme d'AtGRXS15 était exprimée à partir d'un plasmide répliquatif sous le contrôle d'un promoteur fort et constitutif, celui contrôlant normalement l'expression de la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase TDH3 (Moseler *et al.*, 2015). Cette incapacité à compléter le mutant *grx5* étant spécifique à l'isoforme mitochondriale, la question posée était de savoir quels étaient les déterminants de séquence et structuraux à l'origine de cette différence. Plusieurs différences ont été observées sur la base de la comparaison des séquences de différents homologues (figure 37).

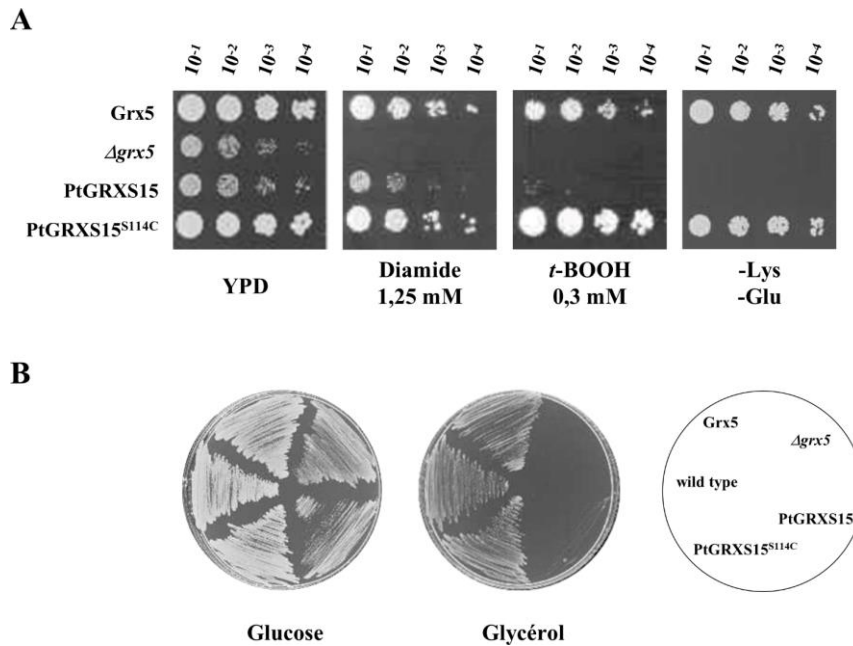


**Figure 37. Alignement des séquences protéiques d'homologues de GRXS15**

Les séquences protéiques matures (*ie* dépourvues des séquences d'adressage mitochondriales) d'homologues de GRXS15 ont été alignées *via* « MUSCLE ». Les structures secondaires sont représentées sur la base de la structure de Tb1-C-Grx1 (pdb : 2LTK). Les régions d'intérêt étudiées dans le cadre de la complémentation du mutant de levure *grx5* ont été mises en évidence : l'extension N-terminale désordonnée (en vert), le résidu Lys strictement conservé impliqué dans la liaison du GSH (en bleu), le résidu Cys du site actif strictement conservé et le résidu Cys partiellement conservé présent dans la région C-terminale de la protéine (rouge) ainsi que l'extrémité C-terminale de la protéine (orange).

La première différence est l'absence d'une seconde cystéine présente au sein d'un motif GGCD habituellement conservé et présent au niveau de l'hélice  $\alpha_4$ . L'insertion de cette cystéine au sein de la séquence de PtGRXS15 permet notamment une complémentation fonctionnelle du mutant de levure *grx5* (figure 38) dans les conditions utilisées lors de la première étude (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). Au lancement de ce projet, la seule fonction connue de cette seconde cystéine était de permettre la fixation d'un centre [4Fe-4S] par ScGrx5 *in vitro* en absence de GSH (Zhang *et al.*, 2013), alors que la mutation de cette cystéine n'affectait pas la capacité du variant à complémenter le mutant *grx5* (Bellí *et al.*, 2002). Afin de tester si cette holo-forme pouvait avoir une fonction physiologique indépendante de celle liant un centre [2Fe-2S] en association avec le GSH, l'insertion de cette cystéine a été couplée à la mutation de la lysine 83 impliquée dans la stabilisation de l'interaction avec le GSH. De précédentes études avaient en effet démontré l'effet délétère de cette mutation (K83A) sur la capacité d'AtGRXS15 à complémenter la souche *grx5* (Moseler *et al.*, 2015). Le simple-variant GRXS15<sup>K83A</sup> a également été intégré à l'étude afin d'approfondir l'étude des effets de cette mutation chez la levure. La deuxième différence est la présence d'une extension N-terminale au sein de la séquence d'AtGRXS15. Cette spécificité est retrouvée au sein de l'ensemble des séquences trouvées chez les plantes mais aussi chez l'homologue présent chez le parasite *Trypanosoma brucei*, Tb1-C-Grx1. L'obtention de la structure de Tb1-C-Grx1 par RMN a permis de mettre en évidence sa nature désordonnée. Il a ainsi été suggéré que cette extension N-terminale puisse adopter un repliement en présence de protéine(s) partenaire(s). Une modification conformationnelle à ce niveau pourrait notamment être importante pour la fonction de transfert du centre Fe-S. Un variant dépourvu de cette extension de 25 AA sera par la suite dénommé  $\Delta 25$ -GRXS15. Dans le même ordre d'idée, ScGrx5 présente dans sa région C-terminale un nombre

important d'AA chargés pouvant être impliqués dans la reconnaissance et l'interaction avec des protéines partenaires. Il a donc été entrepris d'invertir la région C-terminale d'AtGRXS15 et ScGrx5. La région sélectionnée comprend la totalité de l'hélice  $\alpha_5$  de chacune des deux protéines ainsi que la région désordonnée qui s'ensuit, aboutissant ainsi à la génération des variants AtGRXS15-Cter (variant d'AtGRXS15 possédant la région C-terminale de ScGrx5) et ScGrx5-Cter (variant de ScGrx5 possédant la région C-terminale d'AtGRXS15).



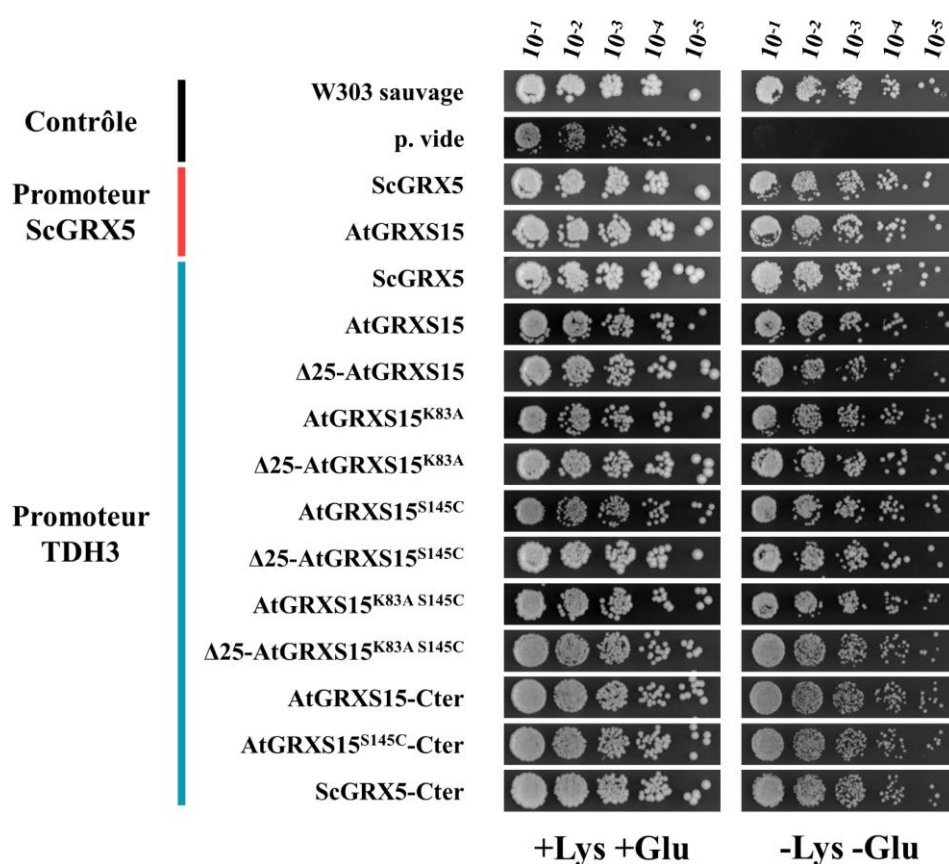
**Figure 38. Effet de l'expression de la protéine PtGRXS15 au sein du mutant *grx5***

Des cellules de levure de la souche *grx5* ont été transformées avec un plasmide permettant l'expression de ScGrx5 ou PtGRXS15 sous le contrôle du promoteur tetO<sub>2</sub> inducible à la doxycycline. Les levures ont été incubées à 30 °C sur milieu contenant 2% de glucose supplémenté avec les acides aminés requis. (A) La résistance des levures à différents oxydants (diamide, t-BOOH), le rétablissement de la prototrophie à la lysine et au glutamate ainsi que (B) leur capacité à croître sur milieu contenant du glycérol ont été testés. Leur croissance est observée après 2 jours à 30°C.

Les séquences codant pour les variants et chimères mentionnés ci-dessus ont été générées par mutagenèse ou par fusion de séquences et insérées dans un premier temps dans le plasmide p426 (multicopie de type 2 $\mu$ ) et p416 (faible copie de type CEN) sous le contrôle du promoteur fort et constitutif TDH3. De plus, les protéines ont été adressées à la mitochondrie par fusion au peptide d'adressage mitochondriale de la sous-unité  $\beta$  du complexe V de *Neurospora crassa*. Dans un second temps, le promoteur et la séquence d'adressage de ScGrx5 ont été intégrées dans les plasmides p416 contenant la séquence codante pour ScGrx5 et AtGRXS15, notamment afin d'obtenir un niveau d'expression physiologique. L'idée de départ était que j'aille dans le laboratoire du Pr Roland Lill (Univ. Marburg) pour effectuer les expériences de complémentation de mutant de levure. Malheureusement, en raison de la pandémie COVID, il n'a pas été possible de me déplacer et les résultats décrits ci-dessous sont ceux utilisant le plasmide p416 et ont été obtenus par le Dr Ulrich Mühlenhoff.

## 1. Analyse des phénotypes de croissance

La capacité de la forme sauvage d'AtGRXS15 et des variants à compléter le mutant *grx5* a été évaluée à travers différents tests. Dans un premier temps, la croissance a été évaluée sur milieu solide en présence ou en absence de lysine et de glutamate afin de tester le rétablissement de la prototrophie pour ces deux AA chez les souches transformées. Afin de restreindre l'analyse à la maturation de protéines mitochondriales, la levée de l'auxotrophie à la leucine n'a pas été analysée. La souche *grx5* ne permet malheureusement pas de tester le rétablissement d'un métabolisme respiratoire fonctionnel en raison d'une accumulation de mutations au niveau du génome mitochondrial dues à un dysfonctionnement des processus de réparation de l'ADN.



**Figure 39. Croissance de la souche sauvage ou du mutant *grx5* de *Saccharomyces cerevisiae* complémenté sur milieu solide en présence ou en absence de lysine et de glutamate**

Des cellules de levure de la souche *grx5* ont été transformées avec le plasmide p416 permettant l'expression de ScGrx5 ou AtGRXS15 sous le contrôle du promoteur endogène de ScGRX5, ou celui du promoteur TDH3. Ce dernier contrôle également l'expression des différents variants d'AtGRXS15. Les levures ont été incubées à 30 °C sur milieu contenant 2% de glucose supplémenté avec les acides aminés requis et en présence (+Lys +Glu) ou en absence (-Lys -Glu) de lysine et de glutamate. Leur croissance est observée après 2 à 3 jours à 30°C.

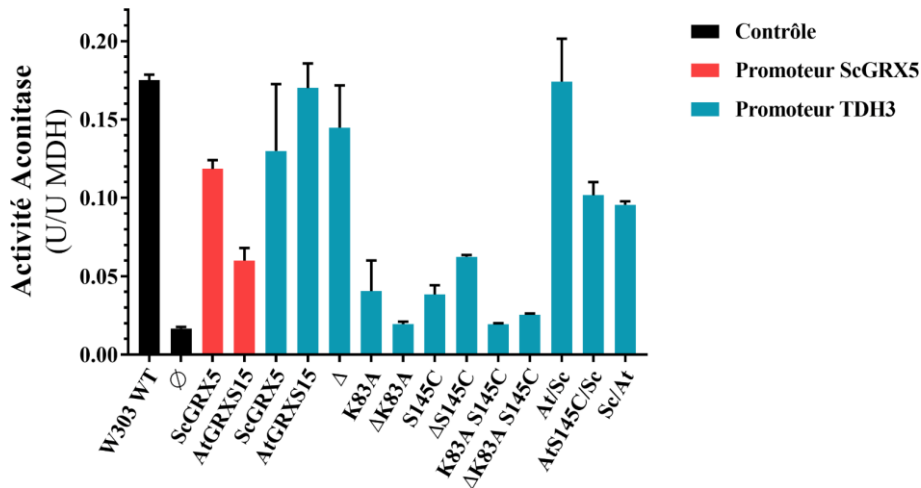
La synthèse de glutamate et de lysine nécessite respectivement l'implication de la glutamate synthase Glt1, liant un centre [3Fe-4S], et de l'homo-aconitase Lys4, liant un centre [4Fe-4S]. Ces deux voies métaboliques requièrent également un apport en oxoglutarate provenant du cycle TCA. Celui-ci

nécessite donc en amont l'implication de l'aconitase Aco1 liant un centre [4Fe-4S] mais également du complexe pyruvate décarboxylase PDC lipoate-dépendant. L'auxotrophie observée chez le mutant *grx5* pour ces deux acides aminés reflète donc vraisemblablement un défaut de maturation de l'une ou plusieurs de ces enzymes. L'expression de ScGrx5, que ce soit sous le contrôle de son promoteur endogène ou celui du promoteur TDH3, permet bien le rétablissement de la prototrophie à ces deux AA. Cependant il semblerait que contrairement aux observations réalisées lors de l'étude de PtGRXS15, l'expression d'AtGRXS15 au sein de la souche *grx5* permette un rétablissement de la prototrophie pour la lysine et le glutamate indépendamment du type de promoteur utilisé. Il est également intrigant que l'expression de chacun des variants de GRXS15, et notamment du variant GRXS15<sup>K83A</sup>, permette une croissance sur milieu dépourvu de lysine et de glutamate à un niveau similaire à celui de la souche sauvage (figure 39).

En conclusion, les résultats obtenus indiquent que l'expression des variants de GRXS15 étudiés permet une maturation suffisante des protéines à centres Fe-S nécessaires à la production de lysine et de glutamate. Les résultats obtenus par le biais de ce test semi-quantitatif ne permettant pas d'obtenir les informations initialement recherchées, les analyses se sont poursuivies par la mesure de l'activité aconitase totale et de l'induction Aft1 dépendante du promoteur FET3.

## 2. Analyse de l'activité aconitase

Afin de quantifier le défaut de maturation des protéines Fe-S, l'activité aconitase (ACO) a été mesurée à partir de protéines solubles issues d'extraits cellulaires. Les mesures présentées ci-dessous représentent donc la somme de l'activité ACO mitochondriale et cytosolique. L'activité d'une seconde enzyme dont le fonctionnement est indépendant des machineries ISC et CIA, la malate déshydrogénase (MDH), a également été mesurée simultanément afin de normaliser les valeurs obtenues à la quantité de protéines extraites. Les résultats obtenus sont donc présentés sous la forme du ratio de l'activité ACO sur l'activité MDH.



**Figure 40. Mesure de l'activité aconitase du mutant *grx5* complétement**

Des cellules de levure de la souche *grx5* ont été transformées avec le plasmide p416 permettant l'expression de ScGrx5, d'AtGRXS15 sous le contrôle du promoteur endogène de ScGRX5 et de ces deux protéines et leurs variants sous le contrôle du promoteur TDH3. Les levures ont été cultivées à 30 °C en milieu liquide contenant 2% de glucose supplémenté avec les acides aminés requis. L'activité ACO totale a été mesurée à partir d'extraits cellulaires de ces cultures par couplage à l'activité isocitrate déshydrogénase et normalisé vis-à-vis de l'activité MDH mesurée à partir de ces mêmes extraits.

L'expression de ScGrx5, que ce soit sous le contrôle de son promoteur endogène ou du promoteur TDH3, permet de restaurer une activité ACO globalement similaire à celle mesurée chez la souche sauvage. Il en est de même pour ce qui est de l'expression d'AtGRXS15 sous le contrôle du promoteur TDH3. En revanche, une réduction d'un facteur ~3 de l'activité ACO est observable chez la souche exprimant AtGRXS15 sous le contrôle du promoteur ScGrx5 (figure 40), indiquant que l'abondance de GRXS15 a un impact sur les niveaux de complémentation.

En ce qui concerne l'étude des différents variants, une faible activité ACO a été mesurée chez l'ensemble des levures exprimant l'un des variants comportant la substitution K83A. Ce résultat confirme ainsi que la capacité d'AtGRXS15 à complétement le mutant *grx5* est corrélée à celle de lier un centre Fe-S *in vivo*. Cet effet est également observé chez la souche exprimant le double-variant K83A S145C indiquant donc que la forme liant un centre [4Fe-4S], si tant est qu'elle existe *in vivo*, ne peut se substituer à celle liant un centre [2Fe-2S] en interaction avec le GSH au sein de la machinerie ISC. De plus, contrairement à ce qui était attendu l'insertion cette seconde cystéine au sein de la séquence d'AtGRXS15 induit une diminution de l'activité aconitase par comparaison avec les mesures obtenues lors de l'expression de la version sauvage de la protéine. Ce résultat est en contradiction avec ceux obtenus par complémentation fonctionnelle avec l'isoforme de peuplier. Cet effet n'a cependant pas été observé lors de l'expression de ce variant par le biais du vecteur p426 et reste donc à confirmer (annexe 3). Les résultats obtenus lors de l'expression des protéines hybrides AtGRXS15-Cter et ScGrx5-Cter suggèrent que l'inversion des extrémités C-terminales des deux protéines a peu d'influence sur la maturation de l'ACO. On peut néanmoins noter que l'introduction de la mutation S145C dans la chimère AtGRXS15-Cter induit une diminution de l'activité aconitase par comparaison avec les mesures

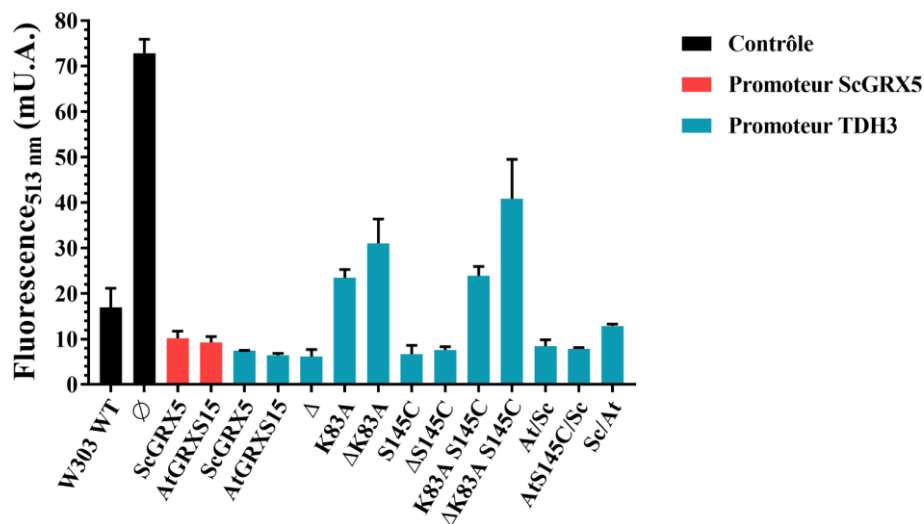


obtenues lors de l'expression du variant AtGRXS15-Cter. Dans le contexte de ce système où GRXS15 complémente les défauts d'activité aconitase, il n'est pas possible de déterminer si la présence de l'extrémité N-terminale d'AtGRXS15 était à l'origine du défaut de complémentation mais sa délétion ne semble avoir aucun effet sur la capacité de la protéine à restaurer l'activité ACO du mutant *grx5* (figure 40).

Afin de déterminer si des effets étaient visibles sur la maturation des protéines Fe-S cytosoliques, un test permettant de mesurer le niveau de maturation du facteur de transcription Aft1 a été réalisé.

### 3. Impact sur la voie d'assimilation du fer

Un défaut de fonctionnement lors des étapes précoces de la machinerie ISC se répercute également sur celui de la machinerie d'assemblage des centres Fe-S cytosolique (CIA). Ce défaut de maturation des protéines Fe-S cytosoliques provoque une accumulation de l'apo-forme du facteur de transcription Aft1 induisant l'expression des gènes et protéines impliqués dans l'assimilation du fer chez la levure (Chen *et al.*, 2004). Le promoteur FET3 reconnu par l'apo-forme d'Aft1 a été intégré dans le plasmide pPS1372, ci-après dénommé pFET3-GFP, où il régule l'expression du gène codant pour la GFP (Molik *et al.*, 2007). La souche *grx5* a été transformée avec le plasmide pFET3-GFP ainsi qu'avec ceux permettant l'expression des variants d'AtGRXS15 et ScGrx5. L'émission de fluorescence à 513 nm causée par l'expression de la GFP a alors été mesurée afin de déterminer l'impact de l'expression des variants étudiés sur le fonctionnement de la machinerie CIA.



**Figure 41. Mesure de l'induction du promoteur FET3 chez le mutant *grx5* complétement**

Des cellules de levure de la souche *grx5* ont été transformées avec le plasmide pFET3-GFP permettant l'expression de la GFP2 sous le contrôle du promoteur FET3 et le plasmide p416 permettant l'expression de ScGrx5, d'AtGRXS15 sous le contrôle du promoteur endogène de ScGRX5 et de ces deux protéines et leurs variants sous le contrôle du promoteur TDH3. Les levures ont été cultivées à 30 °C en milieu liquide contenant 2% de glucose supplémenté avec les acides aminés requis. L'émission de fluorescence à 513 nm totale issue des cellules a été mesurée. L'émission de fluorescence spécifique de la GFP a été calculée par retranchement de la fluorescence émise par des cellules sauvages non transformées à celle des cellules transformées avec le plasmide pFET3-GFP.

On constate une forte induction du promoteur FET3 chez le mutant transformé avec un plasmide vide confirmant ici l'effet de l'absence de ScGrx5 sur la maturation d'Aft1 par la machinerie CIA. L'expression de ScGrx5 et de la forme sauvage d'AtGRXS15, que ce soit sous le contrôle du promoteur de ScGrx5 ou TDH3, permet de rétablir un export de composé soufré vers la machinerie CIA suffisant pour maintenir ScAft1 sous son holo-forme, comme en témoigne l'absence d'induction du promoteur FET3 (figure 41).

Excepté les variants comportant la mutation K83A, tous les autres variants testés étaient fonctionnels et restauraient indirectement le défaut de maturation d'Aft1 (figure 41). L'instabilité de l'holo-forme de ces variants aurait donc un impact sur l'export du composé soufré mitochondrial permettant le fonctionnement de la machinerie CIA. Les variants AtGRXS15<sup>S145C</sup> et  $\Delta$ 25-AtGRXS15<sup>S145C</sup> étaient également fonctionnels dans ce test alors qu'ils ne permettaient qu'un retour partiel de l'activité ACO.

En conclusion, ces tests ont permis de confirmer l'impact de la mutation K83A sur la capacité de la protéine à remplir son rôle au sein de la machinerie ISC en accord avec les résultats démontrant l'effet de cette mutation sur la stabilité de l'holo-forme de la protéine. Ces résultats suggèrent également que l'absence de l'extension N-terminale de GRXS15 n'affecte pas sa fonction chez la levure. Il est malheureusement délicat de tirer des conclusions claires sur l'impact de la mutation S145C et de l'inversion des extrémités C-terminales des protéines ScGrx5 et AtGRXS15 avec ces résultats obtenus lors de l'expression des protéines sous le contrôle du promoteur TDH3. Cependant le défaut d'activité ACO mesuré lors de l'expression d'AtGRXS15 sous le contrôle du promoteur de ScGrx5 suggère que des résultats plus probants auraient pu être obtenus si l'expression des variants avait été placée sous le contrôle de ce promoteur ou encore mieux dans le même cadre que l'expérience réalisée avec les isoformes de peuplier.

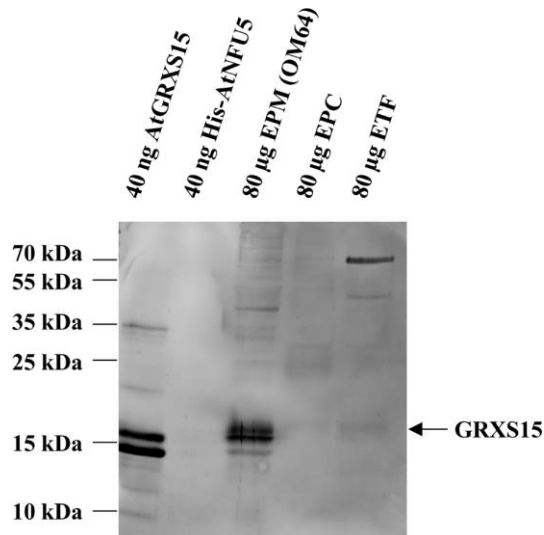
## Chapitre 4 : Recherche de partenaires de GRXS15

Des études réalisées au sein de l'équipe, basées sur les méthodes de double hybride en levure et/ou de complémentation de fluorescence *in planta*, ont mis en évidence des interactions binaires de GRXS15 avec les protéines mitochondriales BOLA1 et BOLA4 (Couturier *et al.*, 2014) et avec les protéines ISCA (Azam *et al.*, 2020a). Par contre, aucune interaction de GRXS15 n'a été détectée que cela soit avec les protéines d'échafaudage ISU1-3 ou avec les protéines chaperons HSCA1/2 et HSCB et MGE1a/b qui sont *a priori* impliquées dans la réaction de transfert de centre Fe-S entre ISU1 et GRXS15. De plus, une interaction entre GRXS15 et une isocitrate déshydrogénase (IDH) a été détectée lors d'expériences de co-IP utilisant IDH1 comme appât, sans qu'un rôle régulateur n'ait été mis en évidence à ce stade (Zhang *et al.*, 2018). Cette observation pourrait suggérer une potentielle activité oxydoréductase de GRXS15, malgré son incapacité à réduire la roGFP2 *in vitro* en présence de GSH et une faible activité d'oxydation de la roGFP2 en présence de GSSG (Moseler *et al.*, 2015).

Dans le but d'initier la recherche de nouveaux partenaires protéiques de GRXS15 sans *a priori*, une expérience de co-immunoprécipitation (co-IP) a été effectuée.

### 1. Isolement de mitochondries par la méthode IMTACT

Une contrainte pouvant limiter la détection de complexes protéiques incluant GRXS15 est son abondance relativement faible au sein des mitochondries (environ 1250 copies pour 1,4 millions de protéines mitochondriales totales) (Fuchs *et al.*, 2020). L'utilisation de la méthode IMTACT (Boussardon *et al.*, 2020), basée sur l'isolement de mitochondries biotinylées par affinité grâce à des billes de streptavidine, a été choisie afin d'obtenir le matériel biologique nécessaire pour cette expérience de co-IP. Cette méthode possède plusieurs avantages par rapport à une méthode classique basée sur l'utilisation d'un gradient de Percoll. Les rendements de protéines mitochondriales obtenus par gramme de feuille sont améliorés (40 - 75 µg de protéines / gramme de feuille avec la méthode IMTACT contre environ 20 µg protéine / gramme de feuille avec une méthode classique (Boussardon *et al.*, 2020; Keech *et al.*, 2005)). La contamination des échantillons par des protéines chloroplastiques, cytosoliques ou encore nucléaires est réduite. Ensuite, le protocole d'extraction est plus rapide (environ 3h à partir du broyage des feuilles) et permet d'obtenir des mitochondries intactes. Ces deux paramètres peuvent avoir leur importance compte tenu de la sensibilité à l'oxygène des centre Fe-S dont la stabilité pourrait être un facteur clé à la détection de certains complexes protéiques. L'utilisation de la méthode IMTACT a permis l'obtention d'un rendement moyen de  $39 \pm 8$  µg de protéines / gramme de feuille.



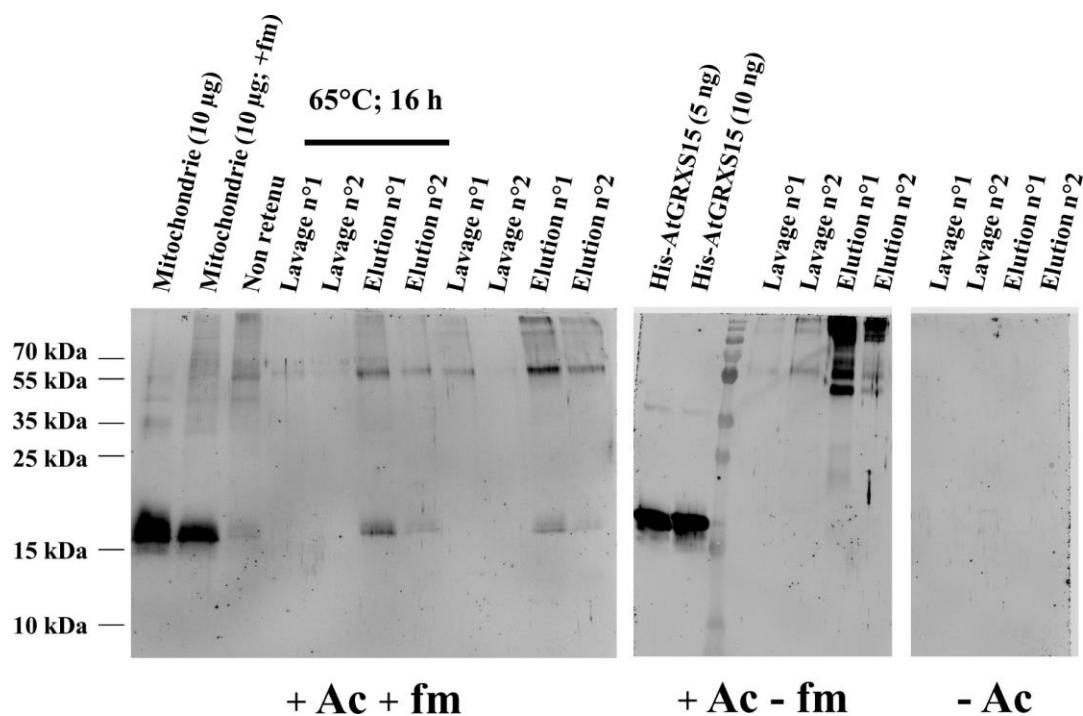
**Figure 42. Vérification de l'enrichissement des protéines mitochondriales grâce à la méthode IMTACT**

Des extraits de protéines totales de feuilles (ETF), mitochondriales (EPM) ou chloroplastiques (EPC) (80 µg) ainsi que les protéines recombinantes AtGRXS15 et His-AtNFU5 (40 ng) ont été séparés sur SDS-PAGE 15% en conditions réductrices. Après séparation, les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose qui a été incubée avec un sérum immun contenant des anticorps  $\alpha$ -AtGRXS15 puis un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome excité à 800 nm dans le proche infra-rouge.

La spécificité des anticorps polyclonaux anti-GRXS15 et la présence de la protéine dans les échantillons de mitochondries purifiées ont d'abord été analysées par western-blot à partir de différentes fractions subcellulaires. Alors qu'un signal faible est détecté dans la fraction de protéines solubles issues de feuilles (ETF) d'*A. thaliana*, trois bandes, de masses égales ou supérieures à 15 kDa et pouvant correspondre à GRXS15, ont été fortement détectées dans la fraction enrichie en protéines mitochondriales (EPM) (figure 42). Bien que la nature de ces bandes ne soient pas parfaitement claires, ce résultat souligne bien la nécessité d'un enrichissement préalable à la réalisation de la co-immunoprécipitation du fait d'une abondance relativement faible de GRXS15.

## 2. Co-immunoprécipitation *in organello*

Des mitochondries intactes, correspondant à 400 µg de protéines mitochondriales, ont été traitées ou non avec 0,5 % de formaldéhyde pendant 30 min à température ambiante. Ce traitement avait pour objectif de figer les complexes protéiques impliquant GRXS15 avant lyse des mitochondries, le formaldéhyde étant en principe capable de franchir les membranes mitochondriales. Après cette incubation, 125 mM de glycine ont été ajoutés afin de saturer les derniers sites réactifs résiduels du formaldéhyde. Les mitochondries sont alors lysées, les billes de streptavidine toujours présentes sont éliminées grâce à un portoir magnétique et l'immunoprécipitation est initiée sur le surnageant par ajout de billes de protéine A préalablement couplée avec l'anticorps  $\alpha$ -AtGRXS15. Après 2 h d'incubation à température ambiante les billes de protéine A sont récoltées, lavées et les complexes protéiques retenus sont élués à l'aide d'un tampon glycine à pH 2,8. Des aliquots des fractions obtenues ont été analysés par western-blot (figure 43).



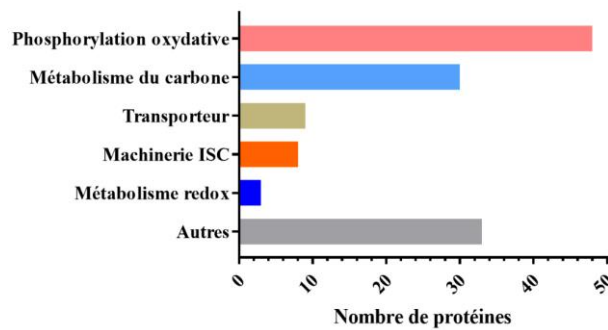
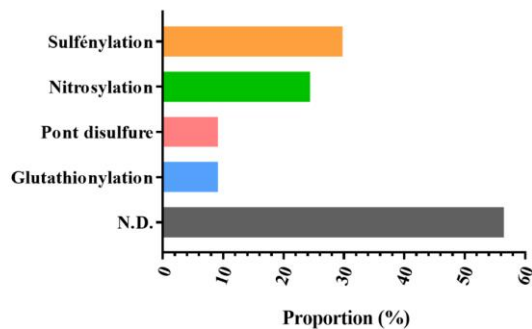
**Figure 43. Analyse des fractions issues des co-IP réalisées avec les anticorps  $\alpha$ -AtGRXS15**

Les échantillons de départ (10  $\mu$ g) traités ou non au formaldéhyde (fm), les protéines non retenues (200  $\mu$ L), les protéines éliminées lors du lavage (100  $\mu$ L), les protéines retenues (20  $\mu$ L) ont été précipités par incubation avec 10% de TCA et repris dans du tampon Laemmli réducteur. Les échantillons indiqués ont été chauffés à 65 °C pendant 16 h. Ces échantillons ainsi que la protéine recombinante His-GRXS15 (5-10 ng) ont ensuite été déposés sur SDS-PAGE 15%. Après séparation, les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose qui a été incubée avec des anticorps  $\alpha$ -AtGRXS15 purifiés. Un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome a été utilisé pour révéler les protéines reconnues par les anticorps primaires par immunofluorescence.

On peut observer que GRXS15 est initialement présente dans la fraction de mitochondrie purifiée dans les quantités attendues (environ 0,1% des protéines mitochondriales). La révélation des protéines *via* l'utilisation d'anticorps  $\alpha$ -AtGRXS15 permet également la visualisation de bandes de plus haut poids moléculaire. Le nombre et l'intensité de ces bandes augmentent après traitement de l'échantillon au formaldéhyde, de manière concomitante à une diminution d'intensité de la bande à 15 kDa. Cette observation suggère un pontage d'une partie des protéines par le formaldéhyde. Les fractions issues de la co-IP qui ont été chauffées à 65°C présentent une diminution d'intensité des bandes à haut poids moléculaire ainsi qu'une augmentation de l'intensité de la bande à 15 kDa en comparaison aux mêmes échantillons non chauffés, suggérant une réversion du pontage *via* ce traitement. Contre intuitivement, les fractions obtenues après co-IP à partir d'extraits mitochondriaux non traités au formaldéhyde présentent un nombre plus important de bandes de haut poids moléculaire ainsi qu'une intensité de ces bandes accentuée par rapport aux fractions issues de co-IP réalisées à partir d'extraits mitochondriaux traités au formaldéhyde. Ceci semble indiquer que le traitement au formaldéhyde pourrait engendrer une diminution de la récupération de protéines de haut poids moléculaire, potentiellement due à une réaction trop importante avec le formaldéhyde induisant leur précipitation et/ou une diminution de la reconnaissance par les anticorps  $\alpha$ -AtGRXS15. Il serait également

envisageable que malgré que les conditions de transfert aient été similaires, le transfert des protéines de haut poids moléculaire n'ait pas toujours été aussi efficace. Enfin, aucun signal n'est observé lorsqu'aucun anticorps n'a été fixé aux billes de protéines au préalable de l'étape de co-IP (figure 43).

Ces différents échantillons ont été analysés par spectrométrie de masse couplée à une chromatographie liquide (LC-MS) en collaboration avec le Dr. Christophe Marchand (IBPS, France). On retrouve bien GRXS15 dans les fractions qui doivent en contenir, bien qu'elle ne soit pas retrouvée parmi les protéines ayant un pourcentage de recouvrement maximal. Parmi les 301 protéines identifiées, seulement 134 (44%) seraient localisées dans la mitochondrie (Uniprot) (tableau 2). Ce résultat démontre une contamination relativement importante des échantillons par des protéines chloroplastiques, cytosoliques, peroxysonales, ribosomales ou encore nucléaires. Compte tenu de la localisation exclusivement mitochondriale de GRXS15, ces protéines ont été considérées comme des contaminants et par conséquent exclues de l'analyse. Les protéines ont été classées selon les voies métaboliques dans lesquelles elles sont impliquées. Les plus représentées sont impliquées dans la phosphorylation oxydative et le métabolisme du carbone (figure 44).

**A****B**

**Figure 44. Fonctions et modifications post-traductionnelles connues des partenaires potentiels de GRXS15 identifiés par co-IP**

(A) Les protéines identifiées par spectrométrie de masse à l'issue de la co-IP utilisant GRXS15 ont été classées selon les voies métaboliques d'intérêts en lien avec les fonctions potentielles de GRXS15. Les voies métaboliques considérées comme non pertinentes ont été regroupées sous la classification « autres ». (B) Les modifications post-traductionnelles subies par les protéines identifiées ont été recensées sur la base d'analyses protéomiques visant à identifier les protéines pouvant subir une sulfénylation (J. Huang et al., 2019; Wei et al., 2020), une nitrosylation (Fares et al., 2011; Hu et al., 2015; Lindermayr et al., 2005; Romero-Puertas et al., 2008) ou une glutathionylation (Dixon et al., 2005; Zaffagnini et al., 2012a). Pour plus de détails, voir tableau 2.

Il est intéressant de noter qu'un certain nombre de protéines impliquées dans les voies métaboliques impactées chez des lignées *grxs15<sup>KO</sup>* complémentées avec le variant GRXS15<sup>K83A</sup> (*GRXS15<sup>K83A</sup>*) (Moseler et al., 2021, 2015) ont été identifiées parmi les interactants potentiels de GRXS15, malgré qu'ils ne lient *a priori* pas de centre Fe-S. Ces protéines sont majoritairement impliquées dans le métabolisme du carbone et une majorité d'entre elles dans le cycle de Krebs. On peut ainsi noter la présence de sous-unités des complexes pyruvate déshydrogénase (PDH ; PDH-E1-A1/B, PDH-E2 1/2/3) et oxoglutarate déshydrogénase (OGDH ; OGDH-E1, OGDH-E2-1/2) ainsi que l'isocitrate déshydrogénase (IDH ; IDH1/5/6), la malate déshydrogénase (mMDH ; mMDH1) et l'enzyme malique NAD-dépendante (NAD-EM ; NAD-EM1/2). Des protéines impliquées dans la photorespiration, la glycine décarboxylase (GDC ; GDC-P1/2, GDC-T) et la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT ; SHMT1/2), ont également été détectées. Une interaction entre GRXS15 et IDH avait préalablement été détectée lors d'expériences de co-IP utilisant IDH1 comme appât (Zhang et al., 2018). Dans le cas des complexes PDC, OGDH et GDC, la diminution d'activité de

ces enzymes et l'accumulation de leurs substrats dans des lignées modifiées pour GRXS15, avaient été reliées à un défaut d'incorporation d'acide lipoïque (Moseler *et al.*, 2021; Ströher *et al.*, 2016).

Il est également intéressant de noter que toutes ces enzymes sont sujettes à au moins une MPT que ce soit une sulfénylation, une nitrosylation, une glutathionylation ou encore la formation de ponts disulfure intramoléculaires ou intermoléculaires. Il est ainsi envisageable que GRXS15 puisse catalyser des réactions d'oxydoréduction avec certaines de ces protéines, même si l'activité oxydoréductase mesurée *via* l'utilisation de substrats non physiologiques (HED, roGFP<sub>2</sub>) est faible.

Des études portant sur les complexes PDH et OGDH de l'Homme ont démontré que la glutathionylation, notamment des sous-unités E2 de chacun de ces complexes, induit une diminution de leur activité (Mailloux *et al.*, 2016; O'Brien *et al.*, 2017). De plus, l'étude de cellules mutées pour GLRX2 a permis de mettre en évidence l'implication de la protéine dans cette modulation (Chalker *et al.*, 2018). La glutathionylation interviendrait au niveau d'un groupement thiol de l'acide lipoïque lié à la sous-unité E2 du complexe OGDH de l'homme (McLain *et al.*, 2013). Les résultats obtenus au cours de cette étude suggèrent également que cette glutathionylation entraîne une diminution d'efficacité de sa reconnaissance par l'anticorps  $\alpha$ -acide lipoïque. Il serait donc envisageable que GRXS15 puisse participer à la régulation de ces complexes *via* la déglutathionylation de l'acide lipoïque lié par les sous-unités E2. Cette hypothèse pourrait permettre également d'expliquer en partie le défaut de reconnaissance des sous-unités E2 des complexes PDH et OGDH extraits de la lignée *GRXS15<sup>amiR</sup>* par l'anticorps  $\alpha$ -acide lipoïque (Ströher *et al.*, 2016).

L'activité du complexe IDH est dépendante de l'association entre une sous-unité régulatrice (IDH1/2/3) et une sous-unité catalytique (IDH5/6). Cette association serait abolie lors de conditions oxydantes par la formation de ponts disulfure intermoléculaires entre 3 monomères de sous-unités régulatrices. Il a également été montré que les thiorédoxines mitochondriales sont capables de réduire cet homotrimère *in vitro* (Yoshida et Hisabori, 2014). Alternativement, une étude portant sur la régulation de l'isoforme IDH cytosolique a mis en évidence un mécanisme impliquant la glutathionylation/nitrosylation de cystéines dont la régénération est permise par les GRX cytosoliques (Niazi *et al.*, 2019). Un mécanisme similaire impliquant GRXS15 serait donc envisageable et pourrait expliquer la présence d'IDH1 au sein des partenaires potentiels de GRXS15 identifiés par co-IP et inversement (Zhang *et al.*, 2018).

Le complexe GDC serait également régulé *via* la formation d'un pont disulfure intramoléculaire sur la sous-unité P et abolissant son activité en condition oxydante (Hasse *et al.*, 2013). La formation de ce type d'oxydation sur la sous-unité GDC-T a également été rapportée et impacterait dans ce cas l'interaction de cette dernière avec la sous-unité GDC-H. La réduction de ce pont disulfure serait permise par les thiorédoxines mitochondriales (Reinholdt *et al.*, 2019). D'autres MPT ont cependant été détectées



sur ces sous-unités telles que des sulfénylations, nitrosylations et glutathionylations (tableau 2) suggérant donc l'existence de mécanismes de régulation redox alternatifs.

La présence d'un nombre important de peptides correspondant à SMHT pourrait suggérer une régulation impliquant l'intervention de GRXS15. Un mécanisme impliquant la formation/réduction d'un pont disulfure au niveau du site actif de SHMT a été suggéré lors de l'étude de l'orthologue présent chez *Plasmodium falciparum* (Chitnumsub *et al.*, 2014). Cependant, l'absence des cystéines impliquées dans la formation de ce pont disulfure dans les isoformes d'*A. thaliana* n'est pas en faveur de l'existence d'un mécanisme de régulation comparable pour la protéine de plante. Cela révèle néanmoins l'intérêt potentiel d'une régulation redox de cette enzyme. De plus, les isoformes d'*A. thaliana* ont toutes deux été retrouvées lors d'études protéomiques visant à détecter les protéines susceptibles de subir une nitrosylation (tableau 2). La pertinence de ce type de régulation chez les plantes reste cependant à démontrer.

Des protéines impliquées dans l'homéostasie redox mitochondriale ont également été retrouvées dans l'échantillon, notamment la protéine CBSX3 (cystathionine b-synthase domain containing protein 3). Les protéines de cette famille ont été identifiées comme des protéines capables de moduler l'activité des TRX en réponse au ratio intracellulaire ADP/ATP (Shin *et al.*, 2020; Yoo *et al.*, 2011). Ainsi CBSX3 permettrait d'améliorer l'activité de TRXo2, effet atténué en présence d'un ratio élevé ADP/ATP. Cette interaction permettrait de réguler la formation d'EOR par le complexe II (Shin *et al.*, 2020). Les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette activation/inhibition ne sont cependant à l'heure actuelle pas encore éclaircis. CBSX3 a également été identifiée comme interagissant suite à une expérience de pull-down visant à identifier les partenaires redox des GRX en utilisant un variant de GRXC4, une isoforme de classe I, dont la seconde cystéine du site actif a été substituée par une sérine (Rouhier *et al.*, 2005). Ces protéines pourraient donc être des effecteurs généralistes des protéines de la famille des TRX et il serait par conséquent intéressant d'étudier l'effet de leur présence sur l'activité de GRXS15 ou d'autres oxydoréductases présentant une faible activité redox. La présence de PRX-IIF soulève également la question de l'implication de GRXS15 dans sa réduction. Plusieurs PRX, dont PRX-IIF, avaient également été identifiées comme interagissant potentiels de GRXC4 (Rouhier *et al.*, 2005) et en accord avec cela GRXC4 catalyse la régénération de PRX-IIF (Gama *et al.*, 2007).

**Tableau 2 : Fonctions et modifications post-traductionnelles des partenaires mitochondriaux potentiels de GRXS15 identifiés par co-IP**

Fonction	AGIID	Gène	MPT	Centre Fe-S	# Peptide
Machinerie ISC	Ai1g65290	ACP2	-	-	2
	Ai5g65720	NFS1	Sulfénylation	-	2
	Ai4g37910	HSCA1	Sulfénylation	-	3
	Ai5g09590	HSCA2	-	-	2
	Ai3g15660	GRXS15	Sulfénylation	[2Fe-2S]	4
	Ai5g61220	ISD11	Sulfénylation	-	2
	Ai4g22220	ISU1	Nitrosylation	[2Fe-2S]	2
	Ai4g26780	MGE1a	-	-	7
	Ai4g02580	CI Sous-unité 24 kDa	-	[2Fe-2S]	4
Phosphorylation oxydative	Ai2g20360	CI Sous-unité 39 kDa	-	-	2
	Ai5g08530	CI Sous-unité 51 kDa	Nitrosylation	[4Fe-4S]	6
	Ai5g57510	CI Sous-unité 75 kDa	Sulfénylation, nitrosylation	[2Fe-2S], 2x[4Fe-4S]	10
	Ai5g52840	CI Sous-unité B13	-	-	5
	Ai3g12260	CI Sous-unité B14	-	-	2
	Ai5g08060	CI Sous-unité B14.5	-	-	3
	Ai2g42210	CI Sous-unité B14.7	-	-	4
	Ai4g34700	CI Sous-unité B22	-	-	4
	Ai1g47260	CI Sous-unité CA2	-	-	7
	Ai5g66510	CI Sous-unité CA3	-	-	3
	Ai3g48680	CI Sous-unité CAL2	-	-	4
	Ai4g16450	CI Sous-unité MNLL	-	-	2
	Ai3g47930	CI Sous-unité GLDH	-	-	2
	AiMg00510	CI Sous-unité ND7	Sulfénylation	-	3
	AiMg00070	CI Sous-unité ND9	-	-	5
	Ai1g67350	CI Sous-unité P1	-	-	2
	Ai2g27730	CI Sous-unité P2	-	-	3
	Ai5g11770	CI Sous-unité PSST	-	-	2
	Ai5g66760	CII SDH1-1	-	[4Fe-4S]	4
	Ai1g47420	CII Sous-unité SDH5	-	-	2
	Ai1g08480	CII Sous-unité SDH6	-	-	2
	Ai3g27240	CIII Sous-unité cytochrome c 1-1	-	-	7
	Ai5g40810	CIII Sous-unité cytochrome c 1-2	-	-	6
	Ai5g13440	CIII Sous-unité UCR1-2	-	-	7
	Ai1g51980	CIII Sous-unité MPPalpha-1	Pont disulfure	[2Fe-2S]	17
	Ai3g16480	CIII Sous-unité MPPalpha-2	-	-	8
	Ai3g02090	CIII Sous-unité MPPbeta	Nitrosylation	-	17
	Ai4g32470	CIII Sous-unité QCR7-1	-	-	7
	Ai3g52730	CIII Sous-unité QCR9	-	-	2
	Ai2g40765	CIII Sous-unité QCR10	-	-	2
	Ai3g08950	CIV facteur de maturation HCCI	-	-	3

Tableau 2 (suite)

Fonction	AGIID	Gène	MPT	Centre Fe-S	# Peptide	
Phosphorylation oxydative	AI1g00160	CIV Sous-unité COX2	-	-	2	
	AI3g15640	CIV Sous-unité COX5b-1	-	-	2	
	AI3g62400	CIV Sous-unité COX5c-2	-	-	2	
	AI3g46430	CV sous-unité 6-A	-	-	2	
	AI1g01190	CV sous-unité alpha	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure	-	21	
	AI5g08680	CV sous-unité beta-2	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure	-	22	
	AI2g21870	CV sous-unité FAD	-	-	5	
	AI2g33040	CV sous-unité gamma	Sulfénylation	-	9	
	AI5g13450	CV sous-unité OSCP	-	-	8	
	AI2g07707	CV sous-unité 8-1	-	-	3	
	AI3g52300	CV sous-unité d	-	-	13	
	AI1g22840	Cyte-1	-	-	2	
	AI4g10040	Cyte-2	-	-	2	
	AI4g28220	NDB1	-	-	2	
	AI2g22500	PUMP5	-	-	2	
	AI5g23300	DHODH	-	-	3	
	Métabolisme du carbone	AI1g59900	PDH-E1-A1	Sulfénylation	-	2
		AI5g50850	PDC-E1-B	Nitrosylation	-	9
		AI3g52200	PDH-E2 1	-	-	2
		AI3g13930	PDH-E2 2	Sulfénylation, pont disulfure	-	11
		AI1g54220	PDH-E2 3	Nitrosylation, pont disulfure	-	5
		AI4g5260	IDH1	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure, glutathionylation	-	3
		AI5g03290	IDH5	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure	-	4
AI3g09810		IDH6	Pont disulfure	-	3	
AI2g20420		SUCB	Sulfénylation, nitrosylation	-	2	
AI3g55410		OGDH-E1	-	-	6	
AI5g5070		OGDH-E2-1	Glutathionylation	-	8	
AI4g26910		OGDH-E2-2	Glutathionylation	-	3	
AI1g53240		mMDH1	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure	-	6	
AI2g13560		NAD-EM1	-	-	17	
AI4g00570		NAD-EM2	Nitrosylation, glutathionylation	-	18	
AI4g33010		GDC-P1	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure, glutathionylation	-	8	
AI2g26080		GDC-P2	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure, glutathionylation	-	5	
AI1g11860		GDC-T	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure	-	8	
AI5g46800		BOU	-	-	7	
AI4g57930		SHMT1	Nitrosylation	-	23	
AI5g26780		SHMT2	Nitrosylation	-	10	
AI4g29130		HXK1	-	-	3	
AI2g19860		HXK2	-	-	3	
Cycle TCA	AI1g59900	PDH-E1-A1	Sulfénylation	-	2	
	AI5g50850	PDC-E1-B	Nitrosylation	-	9	
	AI3g52200	PDH-E2 1	-	-	2	
	AI3g13930	PDH-E2 2	Sulfénylation, pont disulfure	-	11	
	AI1g54220	PDH-E2 3	Nitrosylation, pont disulfure	-	5	
	AI4g5260	IDH1	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure, glutathionylation	-	3	
	AI5g03290	IDH5	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure	-	4	
	AI3g09810	IDH6	Pont disulfure	-	3	
	AI2g20420	SUCB	Sulfénylation, nitrosylation	-	2	
	AI3g55410	OGDH-E1	-	-	6	
	AI5g5070	OGDH-E2-1	Glutathionylation	-	8	
	AI4g26910	OGDH-E2-2	Glutathionylation	-	3	
	AI1g53240	mMDH1	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure	-	6	
Autres	AI2g13560	NAD-EM1	-	-	17	
	AI4g00570	NAD-EM2	Nitrosylation, glutathionylation	-	18	
	AI4g33010	GDC-P1	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure, glutathionylation	-	8	
	AI2g26080	GDC-P2	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure, glutathionylation	-	5	
	AI1g11860	GDC-T	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure	-	8	
	AI5g46800	BOU	-	-	7	
	AI4g57930	SHMT1	Nitrosylation	-	23	
	AI5g26780	SHMT2	Nitrosylation	-	10	
	AI4g29130	HXK1	-	-	3	
	AI2g19860	HXK2	-	-	3	

Tableau 2 (suite)

Fonction	AGIID	Gène	MPT	Centre Fe-S	# Peptide
Métabolisme du carbone	Autres	AI1_g56560	INVA	-	2
		AI1_g17290	ALATI	-	2
Métabolisme redox		AI5_g07440	GDH2	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure	2
		AI3_g13110	SAT3	Sulfénylation, nitrosylation	2
		AI4_g51810	HIBC5	Sulfénylation	2
		AI5_g55630	GLN2	Sulfénylation	6
		AI3_g10370	GPDH	Sulfénylation, glutathionylation	6
		AI3_g10920	MSD1	-	2
		AI3_g06050	PRXIII	Nitrosylation	4
		AI5_g10860	CBSX3	Nitrosylation	5
		AI3_g08580	AAC1	Sulfénylation, nitrosylation	12
		AI5_g58270	ABC25	-	3
Transporteur		AI5_g19760	DTC	Sulfénylation	6
		AI5_g14040	MPT3	Nitrosylation	5
		AI3_g20000	TOM40-1	-	3
		AI3_g01280	VDAC1	-	7
		AI5_g67500	VDAC2	-	6
		AI5_g15090	VDAC3	-	6
		AI5_g57490	VDAC4	-	2
		AI3_g48000	ALDH2B4	Nitrosylation	4
		AI3_g62530	APOK3	Sulfénylation	2
		AI4_g08900	ARGAH1	Nitrosylation, glutathionylation	3
Autres		AI4_g08870	ARGAH2	-	6
		AI4_g22690	CYP706-A1	-	6
		AI4_g12310	CYP706-A5	-	2
		AI4_g32605	Glycoprotéine	-	2
		AI2_g33210	HSP60-2	Sulfénylation, glutathionylation	13
		AI3_g23990	HSP60-3	Sulfénylation, nitrosylation, glutathionylation	14
		AI1_g16030	HSP70-5	-	2
		AI5_g56030	HSP81-2	-	3
		AI3_g07770	HSP90-6	Sulfénylation, nitrosylation, glutathionylation	5
		AI4_g24190	HSP90-7	-	11
		AI1_g65540	LETM2	-	4
		AI4_g59690	MIC60	-	2
		AI5_g27540	MIRO1	Sulfénylation	5
		AI4_g20760	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	Sulfénylation	6
		AI5_g15910	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	-	2
		AI5_g05520	OMP85	-	4
		AI3_g11070	OMP85-like	-	3

Tableau 2 (suite)

Fonction	AGIID	Gène	MPT	Centre Fe-S	# Peptide
	At1g26460	TPR	-	-	4
	At5g09450	TPR	Sulfénylation	-	2
	At3g13160	PPR	Sulfénylation	-	3
	At4g35850	PPR	-	-	5
	At4g28510	PHB1	-	-	2
	At5g40770	PHB3	-	-	4
	At2g20530	PHB6	-	-	2
	At3g22200	POP2	-	-	5
	At1g74230	RBG5	-	-	4
	At3g18580	SSE2	-	-	3
	At1g79230	STR1	-	-	2
	At4g02930	TUFA	Sulfénylation, nitrosylation	-	6
	At1g55160	WAS/WASL-interacting family protein	-	-	2

La prépondérance de protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative s'explique par la présence d'un nombre important de sous-unités des complexes respiratoires. Parmi elles, on retrouve 19 sous-unités du complexe I, 3 sous-unités du complexe II, 9 sous-unités du complexe III, 4 sous-unités du complexe IV et 8 sous-unités du complexe V. Dix d'entre elles ont été montrées comme susceptibles de subir des MPT redox. Cependant, il est aussi possible que la majorité d'entre elles ait été retenue indirectement par interaction avec un ou plusieurs partenaires de GRXS15 faisant partie d'un des complexes. On retrouve ainsi 5 protéines qui lient au moins un centre Fe-S et 3 d'entre elles lient des centres [2Fe-2S], c'est le cas des sous-unités de 24 et 75 kDa du complexe I ainsi que la sous-unité Rieske UCR1 du complexe III. L'implication de GRXS15 dans l'incorporation des centres Fe-S liés par ces protéines reste une piste à considérer bien que cette hypothèse avait précédemment été occultée par l'absence de défaut respiratoire dans le mutant *grxs15* complémenté par le variant *GRXS15<sup>K83A</sup>* (Moseler *et al.*, 2021). Il est néanmoins possible que la surexpression du variant *GRXS15<sup>K83A</sup>*, sous le contrôle du promoteur 35S, permette une maturation suffisante des complexes respiratoires masquant ainsi une diminution de l'activité de ces derniers. Une diminution de l'abondance des complexes I et III est d'ailleurs observable chez la lignée *grxs15<sup>amiR</sup>* (Moseler *et al.*, 2021) et il serait donc intéressant de mesurer l'activité de ces complexes à partir d'extraits mitochondriaux provenant de celle-ci.

Concernant les protéines identifiées et faisant partie de la machinerie ISC, la plupart des acteurs intervenant lors des étapes précoces de la machinerie ont été identifiés dans la fraction co-immunoprécipitée. Ainsi, on peut noter la présence de la protéine d'échafaudage ISU1 et des protéines HSCA1, HSCA2 et MGE1a. Ceci paraît cohérent avec le mécanisme de transfert de centre Fe-S des protéines ISU vers GRXS15 qui implique toutes ces protéines (Uzarska *et al.*, 2013). Le fait de trouver la cystéine désulfurase NFS1 et ses partenaires ISD11 et ACP2, formant le complexe NIA est plus surprenant car GRXS15 n'est pas censée interagir directement avec ces protéines. La frataxine et les FDX mitochondriales ne sont, elles, pas retrouvées. De même, ni NFU4/5, ni les partenaires connus, c'est-à-dire les protéines BOLA (BOLA1, BOLA4) et les protéines de transfert de type A (ISCA1a/b, ISCA2), n'ont été retrouvés dans les conditions utilisées. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les gènes codant pour ces protéines sont relativement peu exprimés dans les feuilles d'*A. thaliana* (Przybyla-Toscano *et al.*, 2021) mais également par l'aspect transitoire de leur interaction avec GRXS15. Les protéines formant le complexe d'assemblage pourraient à l'inverse avoir été identifiées du fait de leur abondance supérieure ou du fait que ce complexe est par nature plus stable que ceux impliquant un transfert de centre Fe-S entre un donneur et un accepteur. Afin de détecter une interaction avec ces acteurs tardifs de la machinerie ISC, il pourrait être plus adapté d'utiliser des mitochondries extraites d'autres organes tels que les racines au sein desquelles l'abondance de leur transcrite est plus élevée (Przybyla-Toscano *et al.*, 2021) ou une autre méthode telle que le marquage de proximité basé sur la biotinylation des partenaires

---

Conclusions générales  
et  
perspectives

---

## IV. Conclusions générales et perspectives

L'objectif principal de ce projet était d'étudier les déterminants moléculaires à l'origine de la nature indispensable de GRXS15 chez les plantes. Compte-tenu des données existantes et notamment des phénotypes observés pour des mutants *grxs15* d'*A. thaliana*, les recherches se sont naturellement focalisées sur son rôle dans le transfert de centre Fe-S au sein de la machinerie ISC et son implication dans la maturation des protéines Fe-S mitochondriales.

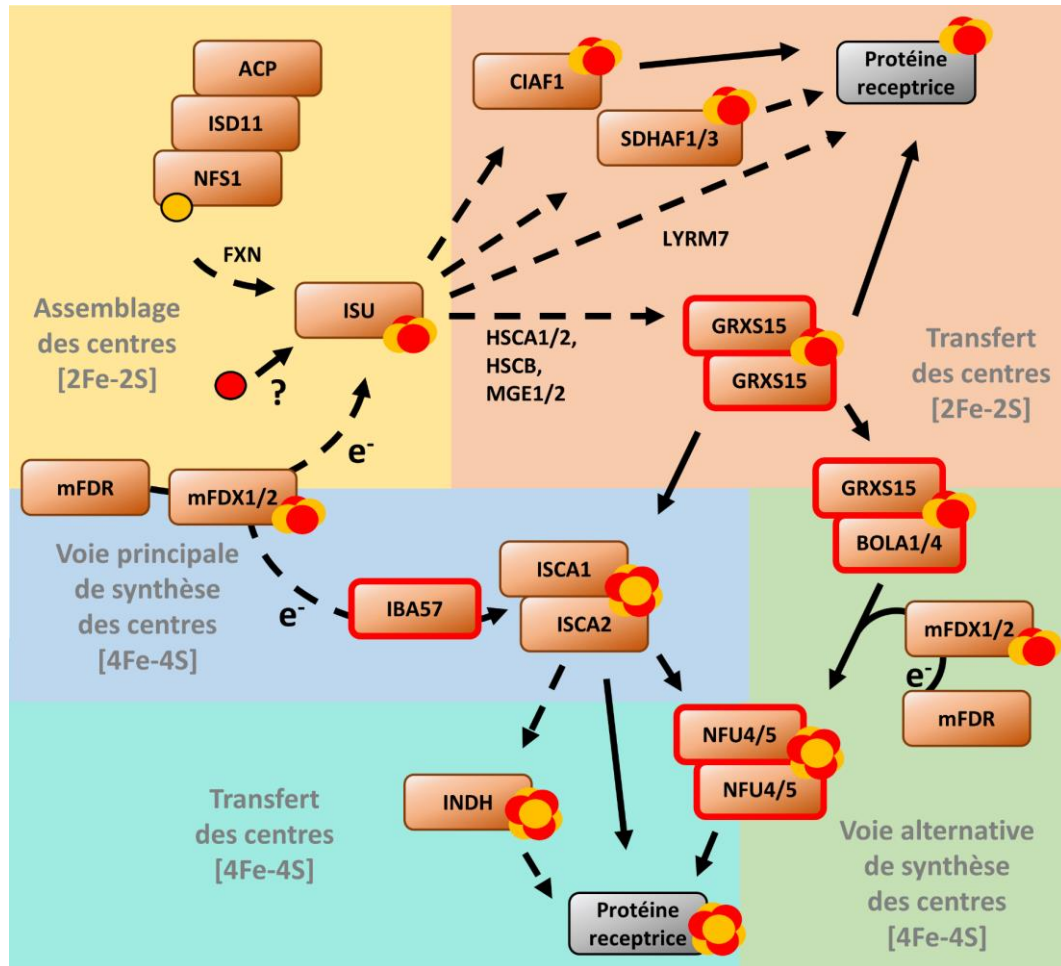
La première étape de synthèse des centres Fe-S par la machinerie ISC consiste en la formation de centre [2Fe-2S] sur la protéine d'échafaudage ISU1-3. Cette étape nécessite un apport de soufre fourni par la cystéine désulfurase NFS1. Les isoformes de mammifères et de levure sont généralement stabilisées grâce à l'interaction avec leurs protéines partenaires ISD11 et ACP formant ainsi le complexe NIA (Gervason *et al.*, 2019; Turowski *et al.*, 2012). La présence de ces protéines au sein des partenaires potentiels de GRXS15 identifiés à la suite d'une expérience de co-immunoprécipitation pourrait cependant suggérer que cette interaction est conservée chez les plantes. La formation de centre Fe-S sur la protéine ISU nécessite également un apport d'électrons qui seraient fournis par une ferrédoxine mitochondriale (Fox *et al.*, 2019; Gervason *et al.*, 2019). Il n'est pas clair si les 2 ferrédoxines mitochondriales présentes chez *A. thaliana* peuvent assurer ce rôle. D'ailleurs, l'isoforme mFDX1 a été montrée comme interagissant avec trois cytochrome P450 mitochondriaux (Bellido *et al.*, 2022), pouvant suggérer des spécificités de fonction entre ces mFDX.

Une fois formé, le centre Fe-S est transféré d'ISU vers GRXS15 *via* l'implication de protéines chaperons. Par analogie avec les études réalisées sur les isoformes de levure (Dutkiewicz *et al.*, 2003; Uzarska *et al.*, 2013), un complexe formé par les protéines HSCA1/2, HSCB et MGE1a permettrait une modification conformationnelle d'ISU induisant l'exposition du centre Fe-S lié par cette dernière et permettant par conséquent son transfert vers GRXS15. Malgré le fait que les isoformes d'*A. thaliana* possèdent l'activité ATPase nécessaire au mécanisme énoncé précédemment et qu'elles permettent la complémentation des mutants de levure (Leaden *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2009), leur interaction avec GRXS15 n'a pas encore été démontrée. A nouveau, on peut noter la présence de ces protéines au sein des interactants potentiels de GRXS15 suggérant que ces interactions préalablement mises en évidence entre les différentes protéines chaperons jouent bien un rôle similaire chez les végétaux.

La formation des centres [4Fe-4S] serait principalement permise grâce au couplage réductif de 2 centres [2Fe-2S] apportés par GRXS15 sur le complexe ISCA1a/2, formant ainsi un centre [4Fe-4S] (Azam *et al.*, 2020a; Brancaccio *et al.*, 2014; Weiler *et al.*, 2020). Ce centre Fe-S peut ensuite être transféré à une protéine cible directement ou par l'intermédiaire des protéines NFU (Azam *et al.*, 2020b). Ce transfert séquentiel de centre Fe-S démontré chez l'homme, la levure et les plantes est considéré comme la voie principale permettant la formation de centres [4Fe-4S] et la maturation des protéines [4Fe-4S] mitochondriales. Cependant, ce modèle ne permet pas d'intégrer le rôle des protéines BOLA



ni même d'IBA57. Une étude récente a permis de mettre en évidence le rôle d'IBA57 au sein de la machinerie. Ainsi, il a été montré qu'elle est impliquée dans le transfert d'électrons fournis par mFDX2 nécessaires au couplage réductif des centres  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  liés par le complexe ISCA1a/2 permettant la formation d'un centre  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  (Weiler *et al.*, 2020).



**Figure 45. Modèle actuel de fonctionnement de la machinerie mitochondriale (ISC) d'assemblage des centres Fe-S chez les plantes**

Les flèches pleines correspondent aux réactions mises en évidence avec des protéines de plante, les flèches en pointillées correspondent aux réactions extrapolées du modèle de levure et de l'Homme, les protéines entourées en rouge correspondent aux protéines pour lesquelles un défaut de fonctionnement entraîne une diminution de taux de maturation des protéines lipolate-dépendantes.

Abréviations utilisées : ACP : transporteur d'acyl ; ISD11 : protéine 11 de la famille LYR ; NFS1 : cystéine désulfurase ; FXN : frataxine ; mFDR : ferrédoxine réductase mitochondriale ; mFDX : ferrédoxine mitochondriale ; ISU : Iscu-like ; HSC : Heat-Shock protein 70 ; MGE : GRPE-like ; CIAF1 : facteur d'assemblage du complexe I ; SDHAF : facteur d'assemblage de la succinate déshydrogénase ; LYRM7 : protéine 7 de la famille LYR ; GRXS15 : glutarédoxine S15 ; ISCA : protéine de transfert type-A ; IBA57 : facteur de maturation des centres Fe-S dédié à la biotine-synthase et l'aconitase ; NFU : NifU-like ; INDH : protéine à centre Fe-S dédié à la NADH-déshydrogénase.

Une fois assemblés, les centres  $[4\text{Fe-4S}]$  sont transférés aux protéines de transfert appartenant à la famille des NifU-like. Chez Arabidopsis, deux isoformes sont présentes dans la mitochondries, NFU4

et NFU5. Leur capacité à recevoir leur centre [4Fe-4S] de l'hétérocomplexe ISCA1a/2 et le transférer à l'aconitase (ACO) a été démontrée *in vitro* (Azam *et al.*, 2020b). Malgré cela, aucune diminution de l'activité ACO n'a été détectée lors de l'étude des mutants *nfu4/5* d'*A. thaliana* (Przybyla-Toscano *et al.*, 2022). Ce résultat révèle donc une possible redondance fonctionnelle entre certains acteurs participant aux étapes tardives de maturation au sein de la machinerie ISC. D'ailleurs, l'hétérocomplexe ISCA1a/2 est aussi capable de transférer un centre [4Fe-4S] à ACO *in vitro*. En revanche, l'absence de NFU4 et NFU5 induit un défaut de maturation de la succinate déshydrogénase et surtout des protéines lipoate-dépendantes (Przybyla-Toscano *et al.*, 2022). Dans la mitochondrie, la synthèse d'acide lipoïque est permise par la lipoate synthase mitochondriale LIP1 liant deux centres [4Fe-4S], dont l'un est sacrifié à chaque cycle catalytique afin d'apporter les atomes de soufre nécessaires à la réaction. Ce défaut de maturation des protéines lipoate-dépendantes est également retrouvé chez les patients atteints d'une mutation du gène *NFUI* (Navarro-Sastre *et al.*, 2011). L'étude des protéines humaines supporte l'idée d'une maturation de la lipoate synthase mitochondriale par les NFU (Warui *et al.*, 2022). Chez les eucaryotes, 4 complexes mitochondriaux dépendent de l'acide lipoïque pour leur activité. La pyruvate déshydrogénase (PDH) et l'oxoglutarate déshydrogénase (OGDH) interviennent dans le cycle de Krebs, l' $\alpha$ -cétoacide à chaîne branchée déshydrogénase (BCKDH) intervient dans le catabolisme des acides aminés branchés et enfin la glycine décarboxylase (GDC) participe à la photorespiration chez les plantes. Un défaut de maturation spécifique de ces complexes est également observé dans les mutants sous exprimant *GRXS15* (*GRXS15<sup>amiR</sup>*; (Ströher *et al.*, 2016)) ou exprimant un variant déficient dans sa capacité à lier un centre Fe-S (*GRXS15<sup>K83A</sup>*; (Moseler *et al.*, 2021)). Une hypothèse permettant d'expliquer l'impact spécifique sur ces complexes observé chez les mutants de la machinerie ISC chez l'Homme et les plantes serait liée à la faible abondance de la lipoate synthase et donc que le flux de centres Fe-S résiduels soit dirigé vers les protéines les plus abondantes. Ainsi lorsque la capacité de la machinerie ISC à soutenir la demande en centres Fe-S de la cellule diminue, le défaut de maturation de LIP1 serait exacerbé par son abondance relativement faible ainsi que par la nécessité du renouvellement de son centre [4Fe-4S] auxiliaire. Cette hypothèse permettrait la résilience accrue à l'absence de *Grx5* observée chez les levures. En effet, l'abondance élevée de la protéine LIP1 chez les levures (environ 6500 copies par cellule contre 85 copies par mitochondrie chez les plantes) pourrait expliquer la viabilité de la souche *grx5* (Fuchs *et al.*, 2020; Ho *et al.*, 2018; Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999). Cet axe de recherche est exploré par Luca Pedroletti à Bonn sous l'encadrement du Pr. A. Meyer. Son travail a permis de démontrer que la diminution de l'expression de l'aconitase mitochondriale, enzyme très abondante liant un centre [4Fe-4S], améliore grandement la croissance des mutants *GRXS15<sup>K83A</sup>* (données non publiées). En revanche, cette hypothèse ne permet d'intégrer le rôle des protéines BOLA, vraisemblablement également impliquées dans les étapes tardives de maturation, au modèle de fonctionnement de la machinerie ISC.

En effet chez l'Homme, les patients atteints d'une mutation du gène BOLA3 présentent un syndrome de déficience mitochondriale multiple (SDMM). Ce syndrome est caractérisé par une diminution significative de l'activité des complexes respiratoires I, II et III, vraisemblablement causé par un défaut de maturation des sous-unités liant un centre Fe-S. De plus, l'activité des complexes PDC, OGDH et GDC est également impactée (Baker *et al.*, 2014; Cameron *et al.*, 2011; Haack *et al.*, 2013). Ce phénotype serait lié à la capacité du complexe GLRX5-BOLA3 de l'Homme à transférer son centre Fe-S à NFU1 et ainsi permettre la formation d'un centre [4Fe-4S], comme cela a été démontré *in vitro* en présence de DTT (Nasta *et al.*, 2020). Dans le cas où cette réaction s'avère pertinente *in vivo*, cela constituerait une voie alternative permettant la formation de centre [4Fe-4S] sans l'intervention des protéines de transfert de type A. Une hypothèse permettant d'expliquer les raisons physiologiques de l'existence de cette voie alternative serait que la spécificité du réseau d'interactions de chaque protéine/complexe permettrait d'orienter le flux de centre Fe-S vers un sous-ensemble de protéines cibles en fonction des besoins de la cellule. Ce flux serait orienté dans la cellule en ajustant l'expression des gènes codant pour ces protéines de transfert. En effet, l'abondance des BOLA et de LIP1 (~80 copies / mitochondrie) ainsi que le profil d'expression des gènes correspondant dans les différents organes sont similaires (Fuchs *et al.*, 2020; Przybyla-Toscano *et al.*, 2021). Je me suis donc focalisé sur l'étude de l'interaction entre GRXS15 et les protéines BOLA.

Les résultats obtenus au cours de ce projet confirment la capacité des protéines BOLA mitochondriales de plantes à interagir avec GRXS15, interaction préalablement mise en évidence par la méthode du double hybride en levure et de complémentation de fluorescence bimoléculaire (Couturier *et al.*, 2014). La ligation d'un centre [2Fe-2S] est strictement nécessaire à l'observation de ces interactions entre GRXS15 et les BOLA *in vitro*. Il n'est cependant pas exclu que des interactions transitoires entre les apo-formes des protéines puissent avoir lieu, tel cela a été mis en évidence lors de l'étude des protéines humaines et d'*E. coli* (Uzarska *et al.*, 2016; Yeung *et al.*, 2011), mais aussi par RMN lors de l'étude des couples GRXS14-BOLA1 (Roret *et al.*, 2014), GLRX5-BOLA1 et GLRX5-BOLA3 (Uzarska *et al.*, 2016). Les méthodes utilisées au cours de cette étude (analyse par chromatographie d'exclusion de taille, ITC) n'ayant pas permis la détection de ce type d'interaction, il serait judicieux d'utiliser la RMN également. Cependant, le rôle physiologique de ces apo-complexes reste incertain, le phénotype des mutants BOLA de l'Homme et de levure étant liés à leur capacité à lier un centre Fe-S en interaction avec les GRX de classe II (Baker *et al.*, 2014; Cameron *et al.*, 2011; Melber *et al.*, 2016; Uzarska *et al.*, 2016).

Les résultats obtenus suggèrent que l'hétérocomplexe GRXS15-BOLA4 est capable de transférer son centre Fe-S à NFU4 en présence de FDX2 et d'induire la formation d'un centre [4Fe-4S], en n'impliquant pas les protéines ISCA et IBA57.1. L'existence de cette voie alternative pour la formation de centre [4Fe-4S] au sein de la mitochondrie pourrait être en accord avec le défaut de maturation des protéines lipoate-dépendantes chez le mutant *grxs15* d'*A. thaliana* exprimant le variant GRXS15<sup>K83A</sup>.

Néanmoins, il est délicat d'aller plus avant dans cette hypothèse en absence de caractérisation de mutants d'*A. thaliana* pour les gènes *BOLA1/4* et *ISCA1/2* et sans avoir analysé la capacité d'un hétérocomplexe GRXS15-BOLA4 à servir de donneur pour la formation d'un centre [4Fe-4S] sur un hétérocomplexe ISCA1/2. Il est toutefois possible d'envisager plusieurs voies parallèles qui pourraient agir soit lorsqu'une voie n'est pas fonctionnelle (par exemple en absence d'expression de certains facteurs de maturation) soit lorsque le flux dirigé vers certaines protéines Fe-S change. Ainsi, si ces changements sont spécifiques à des cibles des protéines ISCA, il peut devenir nécessaire de transférer des centres Fe-S vers les protéines NFU par cette voie alternative.

Chez l'Homme, la présence de BOLA3 est strictement nécessaire au transfert de centre Fe-S depuis GLRX5 vers NFU1. L'incapacité du complexe GLRX5-BOLA1 à participer à cette voie alternative (Nasta *et al.*, 2020) suggère une divergence fonctionnelle des deux BOLA mitochondriales de l'Homme. En effet, les caractéristiques des centres Fe-S liés au sein des hétérocomplexes GLRX5-BOLA1 et GLRX5-BOLA3 diffèrent. Le premier, plus stable en conditions réductrices, permettrait la participation de GLRX5-BOLA1 à des échanges d'électrons tandis que le second, plus labile, permettrait de faciliter le transfert du centre Fe-S (Nasta *et al.*, 2017). D'autre part, il a été observé que la surexpression de BOLA1 induit une résilience accrue de la mitochondrie au stress oxydant et nitrosatif chez l'Homme pouvant suggérer un rôle de protection du centre Fe-S lié par GLRX5 (Willems *et al.*, 2013). Cette hypothèse est soutenue par la surexpression du gène BOLA d'*E. coli* lors de conditions de stress générant des EOR (Santos *et al.*, 1999). Au vu des résultats obtenus lors de l'analyse des hétérocomplexes par chromatographie d'exclusion de taille, le centre Fe-S et/ou l'hétérodimère GRXS15-BOLA1 est également plus stable que celui formé entre GRXS15 et BOLA4 en condition aérobie. La mesure de la stabilité des deux hétérocomplexes en conditions oxydantes (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et réductrices (dithionite) permettrait de comparer les caractéristiques des complexes de plantes et de l'Homme.

Une hypothèse permettant d'expliquer ces différences de stabilité est l'existence d'une coiffe, constituée par l'élongation de la boucle présente entre le brin  $\beta_1$  et  $\beta_2$  de BOLA1, qui pourrait limiter l'exposition du centre Fe-S au solvant. L'étude d'un variant de BOLA4 incluant cette extension (BOLA4-boucle) pourrait par conséquent être intéressante afin de vérifier son implication dans la stabilité de l'hétérocomplexe. Par ailleurs, l'étude d'un variant de BOLA1 muté pour les histidines comprises dans cette boucle (H94 et H97) permettrait de vérifier leur implication potentielle dans la ligation du centre Fe-S et/ou la stabilité accrue du complexe GRXS15-BOLA1.

Enfin, la capacité de celui-ci à transférer son centre Fe-S aux protéines NFU reste à déterminer. En effet, chez la levure les défauts de maturation des protéines à centres [4Fe-4S] (SDH, HiPIP exogène) ou dépendantes de cofacteur lipoate (PDC, OGDH) ne sont observables que chez la souche double mutante *bol1/3*. Ce résultat suggère donc une redondance fonctionnelle des deux BOLA mitochondriales de levure, contrairement à ce qui est observé pour les isoformes humaines (Melber *et al.*, 2016; Uzarska

*et al.*, 2016). De plus, il a été montré que l'expression du gène *BOLA1* d'*A. thaliana* au sein de la souche *boll1/3* permet la restauration du phénotype sauvage démontrant la capacité de la protéine à participer à la formation de centre [4Fe-4S] et/ou la maturation de sous-unités des complexes respiratoires impactés chez le mutant, mais également de la lipoate synthase (Uzarska *et al.*, 2018).

Les spécificités de fonctionnement des machineries de l'Homme et de levure et/ou les différences structurales entre les isoformes des protéines appartenant au sous-groupe BOLA1 à l'origine de ces différences phénotypiques ne sont actuellement pas connues. Il est cependant intéressant de noter que l'élongation de la boucle comprise entre les brins  $\beta_1$  et  $\beta_2$  des isoformes humaine et de souris ne comporte que 6 acides aminés tandis que celles de plante et de levure en comporte 12. La longueur de cette extension pourrait permettre une flexibilité permettant l'exposition de la zone de fixation du centre Fe-S lors d'interactions protéiques. Il pourrait par conséquent être intéressant de tester la capacité d'un variant de HsBOLA1 comportant une boucle allongée telle que présente dans les isoformes de plante ou de levure à transférer son centre Fe-S à NFU1 afin de déterminer l'impact de cette extension sur la capacité de transfert de l'hétérodimère formé avec GLRX5.

En conclusion, la formation de centre [4Fe-4S] sur les protéines NFU mitochondriales *via* l'interaction avec un complexe GRX-BOLA complète le modèle actuel en y intégrant le rôle des protéines BOLA. De plus, une étude portant sur le phénotype des mutants pour les gènes *BOLA1*, *BOLA4* et *BOLA1/4* permettrait d'avoir des informations notamment sur la nature des protéines directement dépendantes des complexes formés avec GRXS15 pour leur maturation chez les plantes. D'autre part, l'analyse de mutants sous-exprimant les gènes ISCA permettrait d'évaluer la capacité de cette voie à subvenir aux besoins essentiels de la cellule.

En dépit de l'importance démontrée de GRXS15 chez les plantes pour le transfert de centre Fe-S, la recherche d'une potentielle activité en tant qu'oxydoréductase n'a pas été négligée. En effet, au commencement de ma thèse la question du système impliqué dans la réduction des protéines mitochondriales glutathionylées chez les plantes se posait. Le fait que la roGFP<sub>2</sub> soit majoritairement réduite dans les mitochondries d'*A. thaliana* (Schwarzländer *et al.*, 2008, 2009) et que les thiorédoxines ne soient pas capables de réduire cette sonde *in vitro* (Meyer *et al.*, 2007) suggérait qu'une autre protéine jusqu'alors non identifiée permettait sa réduction ainsi que celles d'autres protéines glutathionylées. Chez les vertébrés une GRX de classe I, GLRX2, est présente dans la mitochondrie et remplit vraisemblablement ce rôle (Mailloux *et al.*, 2014). Cependant, l'unique représentant de la famille des GRX dans la mitochondrie chez les plantes est GRXS15. De plus, les GRX de classe II n'ont généralement pas ou peu d'activité oxydoréductase *in vitro* (Fernandes *et al.*, 2005; Tamarit *et al.*, 2003; Zaffagnini *et al.*, 2008; Zannini *et al.*, 2018). Cette absence d'activité a été attribuée à des spécificités structurales impactant leur capacité à reconnaître les substrats glutathionylés (demi-réaction oxydative) et à interagir avec le GSH (demi-réaction réductrice) (Begas *et al.*, 2017; Liedgens *et al.*, 2020). Lors de l'étude de GRXS15, seule une faible activité d'oxydation GSSG dépendante de la roGFP<sub>2</sub> a été

détectée *in vitro* (Moseler *et al.*, 2015). Cependant malgré l'absence d'activité réductrice, il a été montré que le GSH est capable de réduire la forme dimérique et la forme monomérique glutathionylée de GRXS15 à des concentrations physiologiques. L'incapacité de GRXS15 à participer à des réactions de réduction serait donc lié à un défaut de reconnaissance des substrats glutathionylés. Cela pourrait être reflété par les concentrations relativement élevées de GSSG nécessaires à son oxydation, en comparaison avec la sensibilité au GSSG mesurée pour GRXS16 par exemple (Zannini *et al.*, 2018). En revanche, la capacité des TRX o mitochondriales à réduire la forme glutathionylée de GRXS15 suggère qu'elles pourraient participer activement à la régénération des protéines glutathionylées dans la mitochondrie des végétaux. En considérant que l'activité de GRXS15 *in vivo* soit concordante avec les mesures réalisées *in vitro*, la protéine responsable de la réduction de la roGFP2 dans la mitochondrie reste inconnue. La présence de sous-unités des complexes PDH, OGDH et GDC parmi les partenaires potentiels de GRXS15 identifiés à la suite de l'expérience de co-IP reste cependant intrigante. Il serait intéressant de tester l'impact de la glutathionylation sur l'activité de ces complexes *in vitro*, et si celle-ci est affectée, la capacité de GRXS15 à la restaurer en présence de GSH.

D'autre part, il est intéressant de noter que GRXS15 présente une sensibilité importante au GSNO en comparaison avec les autres agents oxydants testés. Cela pourrait s'expliquer par l'importante réactivité de la molécule. Néanmoins, lors de l'étude du mutant *GRXS15* complémenté avec le variant *GRXS15<sup>K83A</sup>*, il a été observé que le défaut de développement racinaire de la lignée mutante est exacerbé sur un substrat contenant du nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) en comparaison avec un substrat contenant de l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) (Moseler, 2017). Or, la formation d'espèces nitrées réactives (ENR) chez les plantes serait principalement liée à l'activité de la nitrate réductase (NR) (Rockel *et al.*, 2002). De plus chez l'Homme il a été montré que GRX2 permet une protection des cellules dendritiques contre les effets d'un stress nitrosatif *via* la formation de complexes ferriques di-nitrosylés di-glutathionylés (CFDN) formés par la réaction du NO avec son centre Fe-S (Lepka *et al.*, 2017). La réactivité de GRXS15 avec le GSNO permettrait donc d'envisager un rôle similaire pour holo-GRXS15. Une mesure du spectre de résonance paramagnétique électronique (RPE) d'holo-GRXS15 en réponse à l'ajout d'ENR permettrait de mesurer la formation de CFDN *via* l'apparition d'un signal spécifique à  $g = 2,03$  (Lepka *et al.*, 2017). L'obtention de ce résultat pourrait être le point de départ pour comprendre le phénotype racinaire du mutant *GRXS15<sup>K83A</sup>* sur substrat contenant du  $\text{NO}_3^-$ .

En conclusion, les résultats obtenus lors de ce projet ouvrent des perspectives intéressantes notamment en ce qui concerne l'étude des protéines BOLA1 et BOLA4. La question de la redondance fonctionnelle de ces dernières en dépit des différences de caractéristiques des complexes formés avec GRXS15 reste ouverte, de même que les raisons physiologiques de ces différences. De la même manière, malgré les récentes études tendant à démontrer l'incapacité des GRX de classe II à participer à des réactions d'oxydoréduction, la caractérisation des propriétés redox de GRXS15 et l'identification de

certaines partenaires laissent ouverte la possibilité qu'elle participe à la détoxification de NO ou de ses dérivés ou à la déglutathionylation de certaines protéines mitochondriales

---

# Annexes

---



## V. Annexes

### Annexe 1 : Tableau récapitulatif des modifications post-traductionnelles (MPT) subies par les protéines intervenant dans la chaîne de transport d'électrons mitochondriale

Les modifications post-traductionnelles subies par les protéines identifiées ont été recensées sur la base d'analyses protéomiques visant à identifier les protéines pouvant subir une sulfénylation (J. Huang *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2020), une nitrosylation (Fares *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2015; Lindermayr *et al.*, 2005; Romero-Puertas *et al.*, 2008) ou une glutathionylation (Dixon *et al.*, 2005; Zaffagnini *et al.*, 2012a).

	AGIID	Gène	MPT
complexe I	At3g03070	13 kDa	-
	At3g62790	15 kDa-1	Pont disulfure
	At2g47690	15 kDa-2	Pont disulfure
	At5g67590	18 kDa	-
	At4g02580	24 kDa	-
	At2g20360	39 kDa	-
	At5g08530	51 kDa	Nitrosylation
	At5g37510	75 kDa	Sulfénylation, nitrosylation
	At1g76200	AGGG	-
	At5g47570	ASHI	-
	At1g14450	B12-1	-
	At2g02510	B12-2	-
	At5g52840	B13	Nitrosylation
	At3g12260	B14	-
	At5g08060	B14.5a	-
	At4g20150	B14.5b	-
	At2g42210	B14.7	-
	At2g31490	B15	-
	At1g04630	B16.6-1	-
	At2g33220	B16.6-2	-
	At3g03100	B17.2	-
	At2g02050	B18	Sulfénylation, pont disulfure
	At4g34700	B22	-
	At5g47890	B8	Sulfénylation, pont disulfure
	At2g46540	B9	-
	At1g19580	CA1	-
	At1g47260	CA2	-
	At5g66510	CA3	-
	At5g63510	CAL1	-
	At3g48680	CAL2	-
	At2g42310	ESSS-1	-
	At3g57785	ESSS-2	-
	At3g47930	GLDH	-
	At4g00585	KFYI	-
	At4g16450	MNLL	-
	At3g08610	MWFE	-
	AtMg00516	ND1	-
	AtMg00285	ND2	-
	AtMg00990	ND3	-
	AtMg00580	ND4	-
	AtMg00650	ND4L	-
	AtMg00665	ND5	Sulfénylation
	AtMg00270	ND6	-
	AtMg00510	ND7	Sulfénylation
	AtMg00070	ND9	-
	At1g67350	P1	-
	At2g27730	P2	-
	At3g18410	PDSW-1	-
	At1g49140	PDSW-2	-
	At3g06310	PGIV-1	Pont disulfure
At5g18800	PGIV-2	Sulfénylation, pont disulfure	
At5g11770	PSST	Sulfénylation	
At2g44620	ACP1	Sulfénylation	
At1g67785	SGDH1	-	
At3g10110	TIM22 like-1	-	
At1g18320	TIM22 like-2	-	
At1g79010	TYKY-1	-	
At1g16700	TYKY-2	-	
complexe II	At5g66760	SDH1-1	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure
	At2g18450	SDH1-2	Sulfénylation, pont disulfure
	At3g27380	SDH2-1	-
	At5g40650	SDH2-2	-
	At5g65165	SDH2-3	-
	At5g09600	SDH3-1	-
	At4g32210	SDH3-2	-
	At2g46505	SDH4	-
	At1g47420	SDH5	-
	At1g08480	SDH6	-
At3g47833	SDH7-1	-	
At5g62575	SDH7-2	-	
At2g46390	SDH8	-	

Annexe 1 (suite)

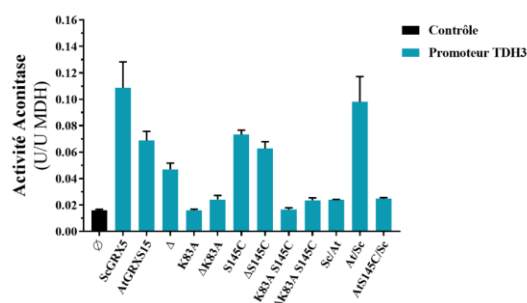
	AGI ID	Gène	MPT
complexe III	AtMg00220	cytochrome b	-
	At3g27240	cytochrome c1-1	-
	At5g40810	cytochrome c1-2	-
	At5g13430	UCR1-1	Pont disulfure
	At5g13440	UCR1-2	Pont disulfure
	At1g51980	MPPalpha-1	-
	At3g16480	MPPalpha-2	-
	At3g02090	MPPbeta	-
	At2g40765	QCR10	-
	At1g15120	QCR6-1	Pont disulfure
	At2g01090	QCR6-2	Pont disulfure
	At4g32470	QCR7-1	-
	At5g25450	QCR7-2	-
	At3g10860	QCR8-1	-
	At5g05370	QCR8-2	-
	At3g52730	QCR9	-
complexe IV	At5g27760	COX X1	-
	At4g00860	COX X2-1	-
	At1g01170	COX X2-2	-
	At4g21105	COX X4	-
	AtMg01360	COX1	-
	AtMg00160	COX2	-
	AtMg00730	COX3-1	-
	At3g15640	COX5b-1	-
	At1g80230	COX5b-2	-
	At2g47380	COX5c-1	-
	At3g62400	COX5c-2	-
	At5g61310	COX5c-3	-
	At4g37830	COX6a	-
	At1g22450	COX6b	Pont disulfure
complexe V	At5g59613	6 kDa	-
	AtMg01190	alpha	-
	At4g30010	ATP17	-
	At5g08670	beta-1	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure, glutathionylation
	At5g08680	beta-2	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure, glutathionylation
	At5g08690	beta-3	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure, glutathionylation
	At5g47030	delta	-
	At1g51650	epsilon	Sulfénylation
	At2g21870	FAD	-
	At2g33040	gamma	Sulfénylation
	At5g13450	OSCP	-
	At2g07707	8	-
	AtMg00410	a-1	Pont disulfure
	AtMg01170	a-2	-
	AtMg00640	b	Sulfénylation
	AtMg01080	c	-
	At3g52300	d	-
At2g19680	g (ATP20-1)	-	
At4g26210	g (ATP20-2)	-	
At4g29480	g (ATP20-3)	-	
Oxydase alternative	At3g22370	AOX1A	Pont disulfure
	At3g22360	AOX1B	Pont disulfure
	At3g27620	AOX1C	Pont disulfure
	At1g32350	AOX1D	Pont disulfure
	At5g64210	AOX2	-
Alternative NADH déshydrogénase	At1g07180	NDA1	-
	At2g29990	NDA2	-
	At4g28220	NDB1	-
	At4g05020	NDB2	-
	At4g21490	NDB3	-
	At2g20800	NDB4	Sulfénylation
At5g08740	NDC1	-	
Cytochrome c	At1g22840	Cyt c-1	-
	At4g10040	Cyt c-2	-
Electron transfer flavoprotéine	At1g50940	ETF-α	-
	At5g43430	ETF-β	-
ETF ubiquinone oxydoréductase	At2g43400	ETFQO	-
D-Lactate déshydrogénase	At5g06580	D-LDH	-
Proline déshydrogénase	At3g30775	ProDH1	-
	At5g38710	ProDH2	-
Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase	At3g10370	GPDH	-
Dihydroorotate déshydrogénase	At5g23300	DHODH	-

## Annexe 2 : Tableau récapitulatif des modifications post-traductionnelles (MPT) subies par les protéines intervenant dans le cycle de Krebs

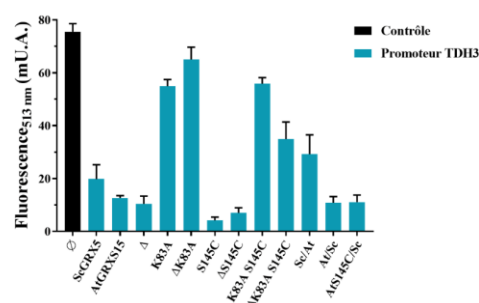
Les modifications post-traductionnelles subies par les protéines identifiées ont été recensées sur la base d'analyses protéomiques visant à identifier les protéines pouvant subir une sulfénylation (J. Huang et al., 2019; Wei et al., 2020), une nitrosylation (Fares *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2015; Lindermayr *et al.*, 2005; Romero-Puertas *et al.*, 2008) ou une glutathionylation (Dixon *et al.*, 2005; Zaffagnini *et al.*, 2012a).

	AGIID	Gène	MPT
Pyruvate déshydrogénase	At1g59900	PDC-E1-A1	Sulfénylation
	At1g24180	PDC-E1-A2	Sulfénylation, nitrosylation
	At5g50850	PDC-E1-B	Nitrosylation
	At3g52200	PDC-E2 1	-
	At3g13930	PDC-E2 2	Sulfénylation, pont disulfure
	At1g54220	PDC-E2 3	Nitrosylation, pont disulfure
	At1g48030	PDC-E3 1	Nitrosylation, pont disulfure
	At3g17240	PDC-E3 2	Sulfénylation, pont disulfure
Citrate synthase	At2g44350	CYS4	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure
	At3g60100	CYS5	Pont disulfure
Aconitase	At4g26970	ACO2	Sulfénylation, nitrosylation, glutathionylation
	At2g05710	ACO3	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure, glutathionylation
Isocitrate déshydrogénase NAD-dépendante	At4g35260	IDH1	Sulfénylation, nitrosylation, glutathionylation
	At2g17130	IDH2	Nitrosylation, glutathionylation
	At4g35650	IDH3	Sulfénylation, glutathionylation
	At1g32480	IDH4	Glutathionylation
	At5g03290	IDH5	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure
	At3g09810	IDH6	Pont disulfure
2-oxoglutarate déshydrogénase complexe 1	At3g55410	OGDC-E1	-
	At5g55070	OGDC-E2-1	Glutathionylation
	At4g26910	OGDC-E2-2	Glutathionylation
Succinate--CoA ligase	At5g08300	SUCA1	Sulfénylation, pont disulfure
	At5g23250	SUCA2	Sulfénylation, pont disulfure
	At2g20420	SUCB	Sulfénylation, nitrosylation
Fumarase	At2g47510	FUM1	Sulfénylation, nitrosylation, glutathionylation
Malate déshydrogénase	At1g53240	mMDH1	Sulfénylation, nitrosylation, pont disulfure
	At3g15020	mMDH2	Nitrosylation, glutathionylation
Enzyme malique NAD-dépendante	At2g13560	NAD-ME1	-
	At4g00570	NAD-ME2	Nitrosylation, glutathionylation

A



B



## Annexe 3 : Mesure de l'activité aconitase et de l'induction du promoteur FET3 chez le mutant *grx5* complétement (série p426)

Des cellules de levure de la souche *grx5* ont été transformées avec le plasmide p426 permettant l'expression de ScGrx5, d'AtGRXS15 et leurs variants sous le contrôle du promoteur TDH3. Les levures ont été cultivées à 30 °C en milieu liquide contenant 2% de glucose supplémenté avec les acides aminés requis. **(A)** L'activité ACO totale a été mesurée à partir d'extraits cellulaires de ces cultures par couplage à l'activité isocitrate déshydrogénase et normalisé vis-à-vis de l'activité MDH mesurée à partir de ces mêmes extraits. **(B)** Alternativement, des cellules de levure de la souche *grx5* ont été transformées avec le plasmide pFET3-GFP permettant l'expression de la GFP2 sous le contrôle du promoteur FET3 ainsi que le plasmide p426 précédemment décrit. Les levures ont été cultivées à 30 °C en milieu liquide contenant 2% de glucose supplémenté avec les acides aminés requis. L'émission de fluorescence à 513 nm totale issue des cellules a été mesurée. L'émission de fluorescence spécifique de la GFP a été calculée par retranchement de la fluorescence émise par des cellules sauvages non transformées à celle des cellules transformées avec le plasmide pFET3-GFP.

**Annexe 4 : Tableau récapitulatif des protéines présentes dans l'échantillon obtenu suite à l'expérience co-immunoprécipitation utilisant GRXS15 comme appât et identifiées par spectrométrie de masse.**

Les protéines ont été classées en fonction du nombre de peptides détectés. Les données sur les localisations subcellulaires des protéines proviennent d'Uniprot.

AGI ID	Gène	Localisation subcellulaire	# Peptides
At4g37930	SHMT1	Mitochondrie	23
At5g08680	Complex V sous-unité beta-2	Mitochondrie	22
AtMg01190	Complex V sous-unité alpha	Mitochondrie	21
AtCg00480	atpB	Chloroplaste	20
At4g00570	NAD-ME2	Mitochondrie	18
At3g02090	Complex III Sous-unité MPPbeta	Mitochondrie	17
At2g13560	NAD-ME1	Mitochondrie	17
At1g51980	Complex III Sous-unité MPPalpha-1	Mitochondrie	17
AtCg00120	atpA	Chloroplaste	14
At3g23990	HSP60-3	Mitochondrie	14
At3g52300	Complex V sous-unité d	Mitochondrie	13
At2g33210	HSP60-2	Mitochondrie	13
AtCg00680	psbB	Chloroplaste	12
At2g39730	RCA	Chloroplaste	12
At3g08580	AAC1	Mitochondrie	12
At4g24190	HSP90-7	Mitochondrie	11
At3g13930	PDC-E2 2	Mitochondrie	11
At4g10340	LHCB5	Chloroplaste	10
At5g37510	Complex I Sous-unité 75 kDa	Mitochondrie	10
At5g26780	SHM2	Mitochondrie	10
At5g42270	FTSH5	Chloroplaste	9
At1g59870	ABCG36	Membrane cellulaire	9
At5g50850	PDC-E1-B	Mitochondrie	9
At2g33040	Complex V sous-unité gamma	Mitochondrie	9
At1g06530	PMD2	Mitochondrie	9
At5g55070	OGDC-E2-1	Mitochondrie	8
At5g13450	Complex V sous-unité OSCP	Mitochondrie	8
At4g33010	GDC-P1	Mitochondrie	8
At3g16480	Complex III Sous-unité MPPalpha-2	Mitochondrie	8
At1g11860	GDC-T	Mitochondrie	8
At5g09660	PMDH2	Peroxisome	8
At3g14420	GLO1	Peroxisome	8
AtCg00350	psaA	Chloroplaste	7
AtCg00280	psbC	Chloroplaste	7
At5g01530	LHCB4.1	Chloroplaste	7
At4g02770	psaD1	Chloroplaste	7
At3g08940	LHCB4.2	Chloroplaste	7
At5g46800	BOU	Mitochondrie	7
At5g13440	Complex III Sous-unité UCR1-2	Mitochondrie	7
At4g32470	Complex III Sous-unité QCR7-1	Mitochondrie	7
At4g26780	MGE1a	Mitochondrie	7
At3g27240	Complex III Sous-unité cytochrome c1-1	Mitochondrie	7
At3g01280	VDAC1	Mitochondrie	7
At1g47260	Complex I Sous-unité CA2	Mitochondrie	7
At2g33150	PED1	Peroxisome	7
At1g15690	AVP1	Vacuole	7
At5g67500	VDAC2	Mitochondrie	6
At4g22690	CYP706-A1	Mitochondrie	6
At4g20760	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	Mitochondrie	6

Annexe 4 (suite)

AGI ID	Gène	Localisation subcellulaire	# Peptides
At3g55410	OGDC-E1	Mitochondrie	6
AtCg00270	psbD	Chloroplaste	6
At5g50920	CLPC1	Chloroplaste	6
At3g46780	PTAC16	Chloroplaste	6
At5g40810	Complex III Sous-unité cytochrome c1-2	Mitochondrie	6
At5g35630	GLN2	Mitochondrie	6
At5g19760	DTC	Mitochondrie	6
At5g15090	VDAC3	Mitochondrie	6
At5g08530	Complex I Sous-unité 51 kDa	Mitochondrie	6
At4g08870	ARGAH2	Mitochondrie	6
At4g02930	TUFA	Mitochondrie	6
At3g10370	GPDH	Mitochondrie	6
At1g53240	mMDH1	Mitochondrie	6
At1g78900	VHA-A	Vacuole	6
At1g15820	CP24	Chloroplaste	6
At2g34430	Lhb1B1	Chloroplaste	5
AtCg00540	petA	Chloroplaste	5
At4g01150	CURT1A	Chloroplaste	5
At1g29930	LHCB1.3	Chloroplaste	5
At1g06950	TIC110	Chloroplaste	5
At5g63400	ADK1	Cytosol	5
AtMg00070	Complex I Sous-unité ND9	Mitochondrie	5
At5g52840	Complex I Sous-unité B13	Mitochondrie	5
At5g27540	MIRO1	Mitochondrie	5
At5g14040	MPT3	Mitochondrie	5
At5g10860	CBSX3	Mitochondrie	5
At4g35850	Pentatricopeptide repeat-containing protein	Mitochondrie	5
At3g22200	POP2	Mitochondrie	5
At3g07770	HSP90-6	Mitochondrie	5
At2g26080	GDC-P2	Mitochondrie	5
At2g21870	Complex V sous-unité FAD	Mitochondrie	5
At1g54220	PDC-E2 3	Mitochondrie	5
At5g25100	TMN9	Appareil de Golgi	5
At5g05520	OMP85	Mitochondrie	4
At1g65540	LETM2	Mitochondrie	4
At5g10840	TMN8	Appareil de Golgi	4
At1g78920	AVPL1	Appareil de Golgi	4
AtCg00340	psaB	Chloroplaste	4
AtCg00130	atpF	Chloroplaste	4
AtCg00020	psbA	Chloroplaste	4
At5g14740	BCA2	Chloroplaste	4
At4g28750	PSAE1	Chloroplaste	4
At4g04640	ATPC1	Chloroplaste	4
At3g54050	CFBP1	Chloroplaste	4
At3g47470	LHCA4	Chloroplaste	4
At3g27690	LHCB2.4	Chloroplaste	4
At3g25860	LTA2	Chloroplaste	4
At2g20260	PSAE2	Chloroplaste	4
At1g44575	PSBS	Chloroplaste	4

Annexe 4 (suite)

AGI ID	Gène	Localisation subcellulaire	# Peptides
At1g42970	GAPB	Chloroplaste	4
At3g18780	ACT2	Cytosol	4
At3g11770	RICE1	Cytosol	4
At4g20260	PCAP1	Membrane cellulaire	4
At5g66760	Complex II SDH1-1	Mitochondrie	4
At5g40770	PHB3	Mitochondrie	4
At5g03290	IDH5	Mitochondrie	4
At4g34700	Complex I Sous-unité B22	Mitochondrie	4
At4g02580	Complex I Sous-unité 24 kDa	Mitochondrie	4
At3g48680	Complex I Sous-unité CAL2	Mitochondrie	4
At3g48000	ALDH2B4	Mitochondrie	4
At3g15660	GRXS15	Mitochondrie	4
At3g06050	PRXIIF	Mitochondrie	4
At2g44350	CSY4	Mitochondrie	4
At2g42210	Complex I Sous-unité B14.7	Mitochondrie	4
At1g74230	RBG5	Mitochondrie	4
At1g26460	Pentatricopeptide repeat-containing protein	Mitochondrie	4
At5g25980	TGG2	ND	4
At2g27710	RPP2B	ND	4
At1g30360	ERD4	ND	4
At1g68010	HPR	Peroxisome	4
At1g20620	CAT3	Peroxisome	4
At5g66680	OST48	Réticulum endoplasmique	4
At5g61790	CNX1	Réticulum endoplasmique	4
At5g60640	PDIL1-4	Réticulum endoplasmique	4
At5g28540	BIP1	Réticulum endoplasmique	4
At3g12800	SDRB	Peroxisome	4
At5g46110	RPL3A	Chloroplaste	3
At5g38660	PSB33	ND	3
At1g71500	RABD2B	Appareil de Golgi	3
At4g27720	BCA1	Chloroplaste	3
At2g35410	petB	Chloroplaste	3
At4g30190	HA2	Membrane cellulaire	3
At5g56030	HSP81-2	Mitochondrie	3
At5g08060	Complex I Sous-unité B14.5	Mitochondrie	3
At3g18580	SSB2	Mitochondrie	3
At3g11070	OMP85-like	Mitochondrie	3
At4g12320	CYP706A6	ND	3
At4g01100	ADNT1	ND	3
AtCg00490	TMN11	Appareil de Golgi	3
At5g47200	RABE1C	Appareil de Golgi	3
AtCg00580	psbE	Chloroplaste	3
At5g42650	LHCA1	Chloroplaste	3
At5g35160	RPL1	Chloroplaste	3
At4g22890	LHCA3	Chloroplaste	3
At3g63490	CYP74A	Chloroplaste	3
At3g54890	KEA1	Chloroplaste	3
At3g46060	rbcL	Chloroplaste	3
At3g01500	PGRL1A	Chloroplaste	3

**Annexe 4 (suite)**

<b>AGI ID</b>	<b>Gène</b>	<b>Localisation subcellulaire</b>	<b># Peptides</b>
At1g61520	PSI type III	Chloroplaste	3
At1g54780	petD	Chloroplaste	3
At1g01790	PSAG	Chloroplaste	3
At1g72150	PATL1	Cytosol	3
At1g55060	UBQ12	Cytosol	3
At2g43030	RPL3A	Membrane cellulaire	3
At1g70410	BCA4	Membrane cellulaire	3
AtMg00510	Complex I Sous-unité ND7	Mitochondrie	3
At5g66510	GAMMACA3	Mitochondrie	3
At5g58270	ABCB25	Mitochondrie	3
At5g23300	DHODH	Mitochondrie	3
At4g37910	HSCA1	Mitochondrie	3
At4g35260	IDH1	Mitochondrie	3
At4g29130	HXK1	Mitochondrie	3
At4g26910	OGDC-E2-2	Mitochondrie	3
At4g08900	ARGAH1	Mitochondrie	3
At3g20000	TOM40-1	Mitochondrie	3
At3g13160	Pentatricopeptide repeat-containing protein	Mitochondrie	3
At3g09810	IDH6	Mitochondrie	3
At3g08950	Complex IV maturation factor HCC1	Mitochondrie	3
At2g27730	Complex I Sous-unité P2	Mitochondrie	3
At2g19860	HXK2	Mitochondrie	3
At2g07707	Complex V sous-unité 8-1	Mitochondrie	3
At4g36250	ALDH3F1	ND	3
At1g64900	CYP89A2	ND	3
At1g55670	PSAG	Chloroplaste	3
At1g56340	CRTI	Réticulum endoplasmique	3
At1g07810	ECA1	Réticulum endoplasmique	3
At3g56460	GroES-like	ND	3
At3g54400	Eukaryotic aspartyl protease family protein	ND	3
At2g38810	HTA8	Noyau	3
At2g28720	HTB3	Noyau	3
At3g13920	TMN12	Appareil de Golgi	2
At3g63160	LHCB3	Chloroplaste	2
At1g55450	RPS14C	Cytosol	2
At5g14670	PIP2-1	Membrane cellulaire	2
At4g33360	RABA1A	Membrane cellulaire	2
At5g61220	ISD11	Mitochondrie	2
At5g15910	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	Mitochondrie	2
At4g32605	Glycoprotein family protein	Mitochondrie	2
At4g16450	Complex I Sous-unité MNLL	Mitochondrie	2
At4g12310	CYP706-A5	Mitochondrie	2
At3g62530	APOK3	Mitochondrie	2
At1g67350	Complex I Sous-unité P1	Mitochondrie	2
At1g64650	ATP6	Mitochondrie	2
At1g55160	WAS/WASL-interacting family protein	Mitochondrie	2
At1g45201	ATP6	Mitochondrie	2
At3g52200	PDIL5-2	ND	2
At3g27570	EIF4A1	ND	2

Annexe 4 (suite)

AGI ID	Gène	Localisation subcellulaire	# Peptides
At3g04830	CRK10	ND	2
At1g29250	TLL1	ND	2
At4g23620	AGT1	Peroxisome	2
At5g04430	BTR1	Apoplaste	2
At4g21150	ESM1	Apoplaste	2
At3g16530	LLP	Apoplaste	2
At5g45750	RABH1B	Appareil de Golgi	2
At4g12650	TMN4	Appareil de Golgi	2
At2g21660	IPUT1	Appareil de Golgi	2
At1g33120	ADP-ribosylation factor A1B	Appareil de Golgi	2
AtCg01060	PSAF	Chloroplaste	2
AtCg00470	FTSH2	Chloroplaste	2
At5g65220	RPL6	Chloroplaste	2
At5g64290	TUFA	Chloroplaste	2
At5g12470	STR4	Chloroplaste	2
At5g03350	psbH	Chloroplaste	2
At4g35250	atpE	Chloroplaste	2
At4g35000	LOX2	Chloroplaste	2
At4g20360	CHLP	Chloroplaste	2
At4g01050	CP29B	Chloroplaste	2
At3g58840	psaC	Chloroplaste	2
At3g42050	rps5	Chloroplaste	2
At3g27830	RPL13	Chloroplaste	2
At2g33800	RPL12A	Chloroplaste	2
At2g30950	DIT2-1	Chloroplaste	2
At1g78630	RPL29	Chloroplaste	2
At1g52230	RER4	Chloroplaste	2
At1g45474	HCF244	Chloroplaste	2
At1g31330	PSAH2	Chloroplaste	2
At1g14850	OEP161	Chloroplaste	2
At1g05190	LHCA5	Chloroplaste	2
At5g61780	RPS18	Cytosol	2
At5g41210	RBG7	Cytosol	2
At3g16470	BTR1	Cytosol	2
At1g35620	TSN2	Cytosol	2
At1g21900	TUBB5	Cytosol	2
At1g08880	HSP70-2	Cytosol	2
AtCg00710	PHOT2	Membrane cellulaire	2
At5g02490	OSCA1	Membrane cellulaire	2
At3g53420	PIP2-1	Membrane cellulaire	2
At1g06400	RABA1C	Membrane cellulaire	2
AtMg00160	Complex IV Sous-unité COX2	Mitochondrie	2
At5g65720	NFS1	Mitochondrie	2
At5g57490	VDAC4	Mitochondrie	2
At5g11770	Complex I Sous-unité PSST	Mitochondrie	2
At5g09590	HSCA2	Mitochondrie	2
At5g09450	Pentatricopeptide repeat-containing protein	Mitochondrie	2
At5g07440	GDH2	Mitochondrie	2
At4g39690	MIC60	Mitochondrie	2



Annexe 4 (suite)

AGI ID	Gène	Localisation subcellulaire	# Peptides
At4g31810	HIBC5	Mitochondrie	2
At4g28510	PHB1	Mitochondrie	2
At4g28220	NDB1	Mitochondrie	2
At4g22220	ISU1	Mitochondrie	2
At4g10040	Cytc-2	Mitochondrie	2
At3g62400	Complex IV Sous-unité COX5c-2	Mitochondrie	2
At3g52730	Complex III Sous-unité QCR9	Mitochondrie	2
At3g52580	RPS19	Mitochondrie	2
At3g47930	Complex I Sous-unité GLDH	Mitochondrie	2
At3g15640	Complex IV Sous-unité COX5b-1	Mitochondrie	2
At3g13110	SAT3	Mitochondrie	2
At3g12260	Complex I Sous-unité B14	Mitochondrie	2
At3g10920	MSD1	Mitochondrie	2
At2g40765	Complex III Sous-unité QCR10	Mitochondrie	2
At2g22500	PUMP5	Mitochondrie	2
At2g20530	PHB6	Mitochondrie	2
At2g20420	SUCB	Mitochondrie	2
At2g20360	Complex I Sous-unité 39 kDa	Mitochondrie	2
At1g79230	STR1	Mitochondrie	2
At1g65290	ACP2	Mitochondrie	2
At1g59900	PDC-E1-A1	Mitochondrie	2
At1g56560	INVA	Mitochondrie	2
At1g47420	Complex II Sous-unité SDH5	Mitochondrie	2
At1g22840	Cytc-1	Mitochondrie	2
At1g17290	ALAT1	Mitochondrie	2
At1g16030	HSP70-5	Mitochondrie	2
At1g08480	Complex II Sous-unité SDH6	Mitochondrie	2
AtCg00720	LTA3	ND	2
At5g61170	RPL22C	ND	2
At5g47320	RPP0B	ND	2
At5g27770	SAHH1	ND	2
At5g18480	JAL35	ND	2
At4g23180	CYP83B1	ND	2
At4g21180	ERDJ2B	ND	2
At4g13940	SAHH1	ND	2
At3g51420	FLDH	ND	2
At3g46430	F16M2_10	ND	2
At3g09200	RPL9B	ND	2
At2g44610	RABH1B	ND	2
At2g37220	CP29B	ND	2
At2g13360	AGT1	ND	2
At1g22780	RPS19C	ND	2
At5g58140	PHOT2	Noyau	2
At3g45140	NUP155	Noyau	2
At1g23310	GSTT1	Noyau	2
At3g14210	GGAT1	Peroxisome	2
At2g28900	PMD1	Peroxisome	2
At1g74470	APX3	Peroxisome	2
AtCg00730	ERDJ2B	Réticulum endoplasmique	2

**Annexe 4 (suite)**

<b>AGI ID</b>	<b>Gène</b>	<b>Localisation subcellulaire</b>	<b># Peptides</b>
At5g54270	CRT2	Réticulum endoplasmique	2
At5g37310	TMN4	Réticulum endoplasmique	2
At4g31500	RPN2	Réticulum endoplasmique	2
At4g04340	RHD3	Réticulum endoplasmique	2
At1g09210	CRT2	Réticulum endoplasmique	2
At3g13870	SSL4	Vacuole	2
At1g20010	VHA-H	Vacuole	2

---

# Références

---

## VI. Références

- Albrecht, S.C., Sobotta, M.C., Bausewein, D., Aller, I., Hell, R., Dick, T.P., Meyer, A.J., 2014. Redesign of Genetically Encoded Biosensors for Monitoring Mitochondrial Redox Status in a Broad Range of Model Eukaryotes. *SLAS Discovery* 19, 379–386. <https://doi.org/10.1177/1087057113499634>
- Aller, I., Rouhier, N., Meyer, A.J., 2013. Development of roGFP2-derived redox probes for measurement of the glutathione redox potential in the cytosol of severely glutathione-deficient *rml1* seedlings. *Front. Plant Sci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00506>
- Attacha, S., Solbach, D., Bela, K., Moseler, A., Wagner, S., Schwarzländer, M., Aller, I., Müller, S.J., Meyer, A.J., 2017. Glutathione peroxidase-like enzymes cover five distinct cell compartments and membrane surfaces in *Arabidopsis thaliana*: Subcellular localization of GPXLs in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* 40, 1281–1295. <https://doi.org/10.1111/pce.12919>
- Azam, T., Przybyla-Toscano, J., Vignols, F., Couturier, J., Rouhier, N., Johnson, M.K., 2020a. The Arabidopsis Mitochondrial Glutaredoxin GRXS15 Provides [2Fe-2S] Clusters for ISCA-Mediated [4Fe-4S] Cluster Maturation. *IJMS* 21, 9237. <https://doi.org/10.3390/ijms21239237>
- Azam, T., Przybyla-Toscano, J., Vignols, F., Couturier, J., Rouhier, N., Johnson, M.K., 2020b. [4Fe-4S] cluster trafficking mediated by Arabidopsis mitochondrial ISCA and NFU proteins. *Journal of Biological Chemistry* 295, 18367–18378. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015726>
- Baker, P.R., Friederich, M.W., Swanson, M.A., Shaikh, T., Bhattacharya, K., Scharer, G.H., Aicher, J., Creadon-Swindell, G., Geiger, E., MacLean, K.N., Lee, W.-T., Deshpande, C., Freckmann, M.-L., Shih, L.-Y., Wasserstein, M., Rasmussen, M.B., Lund, A.M., Procopis, P., Cameron, J.M., Robinson, B.H., Brown, G.K., Brown, R.M., Compton, A.G., Dieckmann, C.L., Collard, R., Coughlin, C.R., Spector, E., Wempe, M.F., Van Hove, J.L.K., 2014. Variant non ketotic hyperglycinemia is caused by mutations in LIAS, BOLA3 and the novel gene GLRX5. *Brain* 137, 366–379. <https://doi.org/10.1093/brain/awt328>
- Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M.M., Gualberto, J.M., Claxton, R., Naik, S.G., Huynh, B.H., Herrero, E., Jacquot, J.P., Johnson, M.K., Rouhier, N., 2008. Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe–2S] clusters. *EMBO J* 27, 1122–1133. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.50>
- Barranco-Medina, S., Krell, T., Bernier-Villamor, L., Sevilla, F., Lazaro, J.-J., Dietz, K.-J., 2008. Hexameric oligomerization of mitochondrial peroxiredoxin PrxIIF and formation of an ultrahigh affinity complex with its electron donor thioredoxin Trx-o. *Journal of Experimental Botany* 59, 3259–3269. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern177>
- Barroso, J.B., Valderrama, R., Corpas, F.J., 2013. Immunolocalization of S-nitrosoglutathione, S-nitrosoglutathione reductase and tyrosine nitration in pea leaf organelles. *Acta Physiol Plant* 35, 2635–2640. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1291-0>
- Bashir, K., Inoue, H., Nagasaka, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N.K., 2006. Cloning and Characterization of Deoxymugineic Acid Synthase Genes from Gramineous Plants. *Journal of Biological Chemistry* 281, 32395–32402. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604133200>
- Bashir, K., Ishimaru, Y., Shimo, H., Nagasaka, S., Fujimoto, M., Takanashi, H., Tsutsumi, N., An, G., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K., 2011. The rice mitochondrial iron transporter is essential for plant growth. *Nat Commun* 2, 322. <https://doi.org/10.1038/ncomms1326>
- Begas, P., Liedgens, L., Moseler, A., Meyer, A.J., Deponte, M., 2017. Glutaredoxin catalysis requires two distinct glutathione interaction sites. *Nat Commun* 8, 14835. <https://doi.org/10.1038/ncomms14835>

- Bellido, A.M., Distéfano, A.M., Setzes, N., Cascallares, M.M., Oklestkova, J., Novak, O., Ramirez, J.A., Zabaleta, E.J., Fiol, D.F., Pagnussat, G.C., 2022. A mitochondrial ADXR–ADX–P450 electron transport chain is essential for maternal gametophytic control of embryogenesis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 119, e2000482119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2000482119>
- Bellí, G., Polaina, J., Tamarit, J., De La Torre, M.A., Rodríguez-Manzanares, M.T., Ros, J., Herrero, E., 2002. Structure-Function Analysis of Yeast Grx5 Monothiol Glutaredoxin Defines Essential Amino Acids for the Function of the Protein. *Journal of Biological Chemistry* 277, 37590–37596. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201688200>
- Berndt, C., Schwenn, J.-D., Lillig, C.H., 2015. The specificity of thioredoxins and glutaredoxins is determined by electrostatic and geometric complementarity. *Chem. Sci.* 6, 7049–7058. <https://doi.org/10.1039/C5SC01501D>
- Bethke, P.C., Badger, M.R., Jones, R.L., 2004. Apoplastic Synthesis of Nitric Oxide by Plant Tissues. *Plant Cell* 16, 332–341. <https://doi.org/10.1105/tpc.017822>
- Billiet, L., Geerlings, P., Messens, J., Roos, G., 2012. The thermodynamics of thiol sulfenylation. *Free Radical Biology and Medicine* 52, 1473–1485. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.12.029>
- Biteau, B., Labarre, J., Toledano, M.B., 2003. ATP-dependent reduction of cysteine–sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425, 980–984. <https://doi.org/10.1038/nature02075>
- Boniecki, M.T., Freibert, S.A., Mühlenhoff, U., Lill, R., Cygler, M., 2017. Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex. *Nat Commun* 8, 1287. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01497-1>
- Boussardon, C., Przybyla-Toscano, J., Carrie, C., Keech, O., 2020. Tissue-specific isolation of *Arabidopsis*/plant mitochondria – IMTACT (isolation of mitochondria tagged in specific cell types). *Plant J* 103, 459–473. <https://doi.org/10.1111/tpj.14723>
- Brancaccio, D., Gallo, A., Mikolajczyk, M., Zovo, K., Palumaa, P., Novellino, E., Piccioli, M., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L., 2014. Formation of [4Fe-4S] Clusters in the Mitochondrial Iron–Sulfur Cluster Assembly Machinery. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 16240–16250. <https://doi.org/10.1021/ja507822j>
- Briat, J.-F., Duc, C., Ravet, K., Gaymard, F., 2010. Ferritins and iron storage in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1800, 806–814. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.12.003>
- Broniowska, K.A., Diers, A.R., Hogg, N., 2013. S-Nitrosoglutathione. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830, 3173–3181. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.004>
- Cai, K., Frederick, R.O., Tonelli, M., Markley, J.L., 2017. Mitochondrial Cysteine Desulfurase and ISD11 Coexpressed in *Escherichia coli* Yield Complex Containing Acyl Carrier Protein. *ACS Chem. Biol.* 12, 918–921. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01005>
- Calabrese, G., Morgan, B., Riemer, J., 2017. Mitochondrial Glutathione: Regulation and Functions. *Antioxidants & Redox Signaling* 27, 1162–1177. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7121>
- Cameron, J.M., Janer, A., Levandovskiy, V., MacKay, N., Rouault, T.A., Tong, W.-H., Ogilvie, I., Shoubridge, E.A., Robinson, B.H., 2011. Mutations in Iron-Sulfur Cluster Scaffold Genes NFU1 and BOLA3 Cause a Fatal Deficiency of Multiple Respiratory Chain and 2-Oxoacid Dehydrogenase Enzymes. *The American Journal of Human Genetics* 89, 486–495. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.08.011>
- Castaigns, L., Caquot, A., Loubet, S., Curie, C., 2016. The high-affinity metal Transporters NRAMP1 and IRT1 Team up to Take up Iron under Sufficient Metal Provision. *Sci Rep* 6, 37222. <https://doi.org/10.1038/srep37222>

- Chalker, J., Gardiner, D., Kuksal, N., Mailloux, R.J., 2018. Characterization of the impact of glutaredoxin-2 (GRX2) deficiency on superoxide/hydrogen peroxide release from cardiac and liver mitochondria. *Redox Biology* 15, 216–227. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.12.006>
- Chamizo-Ampudia, A., Sanz-Luque, E., Llamas, Á., Ocaña-Calahorra, F., Mariscal, V., Carreras, A., Barroso, J.B., Galván, A., Fernández, E., 2016. A dual system formed by the ARC and NR molybdoenzymes mediates nitrite-dependent NO production in *Chlamydomonas*: *Chlamydomonas* ARC and NR in NO production. *Plant, Cell & Environment* 39, 2097–2107. <https://doi.org/10.1111/pce.12739>
- Chen, O.S., Crisp, R.J., Valachovic, M., Bard, M., Winge, D.R., Kaplan, J., 2004. Transcription of the Yeast Iron Regulon Does Not Respond Directly to Iron but Rather to Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 279, 29513–29518. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403209200>
- Chibani, K., Wingsle, G., Jacquot, J.-P., Gelhaye, E., Rouhier, N., 2009. Comparative Genomic Study of the Thioredoxin Family in Photosynthetic Organisms with Emphasis on *Populus trichocarpa*. *Molecular Plant* 2, 308–322. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn076>
- Chitnumsub, P., Ittarat, W., Jaruwat, A., Noytanom, K., Amornwatcharapong, W., Pornthanakasem, W., Chaiyen, P., Yuthavong, Y., Leartsakulpanich, U., 2014. The structure of *Plasmodium falciparum* serine hydroxymethyltransferase reveals a novel redox switch that regulates its activities. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 70, 1517–1527. <https://doi.org/10.1107/S1399004714005598>
- Chow, L.-P., Iwadate, H., Yano, K., Kamo, M., Tsugita, A., Gardet-Salvi, L., Stritt-Etter, A.-L., Schurmann, P., 1995. Amino Acid Sequence of Spinach Ferredoxin:Thioredoxin Reductase Catalytic Subunit and Identification of Thiol Groups Constituting a Redox-Active Disulfide and a [4Fe-4S] Cluster. *Eur J Biochem* 231, 149–156. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20681.x>
- Conte, S., Stevenson, D., Furner, I., Lloyd, A., 2009. Multiple Antibiotic Resistance in *Arabidopsis* Is Conferred by Mutations in a Chloroplast-Localized Transport Protein. *Plant Physiology* 151, 559–573. <https://doi.org/10.1104/pp.109.143487>
- Cooney, R.V., Harwood, P.J., Custer, L.J., Franke, A.A., 1994. Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environmental Health Perspectives* 102, 460–462. <https://doi.org/10.1289/ehp.94102460>
- Cory, S.A., Van Vranken, J.G., Brignole, E.J., Patra, S., Winge, D.R., Drennan, C.L., Rutter, J., Barondeau, D.P., 2017. Structure of human Fe–S assembly subcomplex reveals unexpected cysteine desulfurase architecture and acyl-ACP–ISD11 interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702849114>
- Couturier, J., Jacquot, J.-P., Rouhier, N., 2013. Toward a refined classification of class I dithiol glutaredoxins from poplar: biochemical basis for the definition of two subclasses. *Front. Plant Sci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00518>
- Couturier, J., Jacquot, J.-P., Rouhier, N., 2009. Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 2539–2557. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0054-y>
- Couturier, J., Wu, H.-C., Dhalleine, T., Pégeot, H., Sudre, D., Gualberto, J.M., Jacquot, J.-P., Gaymard, F., Vignols, F., Rouhier, N., 2014. Monothiol Glutaredoxin–BolA Interactions: Redox Control of *Arabidopsis thaliana* BolA2 and SufE1. *Molecular Plant* 7, 187–205. <https://doi.org/10.1093/mp/sst156>
- Dai, S., Schwendtmayer, C., Schürmann, P., Ramaswamy, S., Eklund, H., 2000. Redox Signaling in Chloroplasts: Cleavage of Disulfides by an Iron-Sulfur Cluster. *Science* 287, 655–658. <https://doi.org/10.1126/science.287.5453.655>

- Daloso, D.M., Müller, K., Obata, T., Florian, A., Tohge, T., Bottcher, A., Riondet, C., Bariat, L., Carrari, F., Nunes-Nesi, A., Buchanan, B.B., Reichheld, J.-P., Araújo, W.L., Fernie, A.R., 2015. Thioredoxin, a master regulator of the tricarboxylic acid cycle in plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424840112>
- DiDonato, R.J., Roberts, L.A., Sanderson, T., Easley, R.B., Walker, E.L., 2004. *Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2)*: a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *The Plant Journal* 39, 403–414. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02128.x>
- Divol, F., Couch, D., Conéjéro, G., Roschztardt, H., Mari, S., Curie, C., 2013. The *Arabidopsis* YELLOW STRIPE LIKE4 and 6 Transporters Control Iron Release from the Chloroplast. *The Plant Cell* 25, 1040–1055. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.107672>
- Dixon, D.P., Skipsey, M., Grundy, N.M., Edwards, R., 2005. Stress-Induced Protein S - Glutathionylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 138, 2233–2244. <https://doi.org/10.1104/pp.104.058917>
- Dlouhy, A.C., Li, H., Albetel, A.-N., Zhang, B., Mapolelo, D.T., Randeniya, S., Holland, A.A., Johnson, M.K., Outten, C.E., 2016. The *Escherichia coli* BolA Protein IbaG Forms a Histidine-Ligated [2Fe-2S]-Bridged Complex with Grx4. *Biochemistry* 55, 6869–6879. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00812>
- Durrett, T.P., Gassmann, W., Rogers, E.E., 2007. The FRD3-Mediated Efflux of Citrate into the Root Vasculature Is Necessary for Efficient Iron Translocation. *Plant Physiol.* 144, 197–205. <https://doi.org/10.1104/pp.107.097162>
- Dutkiewicz, R., Schilke, B., Knieszner, H., Walter, W., Craig, E.A., Marszalek, J., 2003. Ssq1, a Mitochondrial Hsp70 Involved in Iron-Sulfur (Fe/S) Center Biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 29719–29727. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303527200>
- Duy, D., Wanner, G., Meda, A.R., von Wirén, N., Soll, J., Philippar, K., 2007. PIC1, an Ancient Permease in *Arabidopsis* Chloroplasts, Mediates Iron Transport. *The Plant Cell* 19, 986–1006. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047407>
- Edwards, E.A., Rawsthorne, S., Mullineaux, Philip M., 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180. <https://doi.org/10.1007/BF00194008>
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., Gueriot, M.L., 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5624–5628. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5624>
- Enoksson, M., Fernandes, A.P., Prast, S., Lillig, C.H., Holmgren, A., Orrenius, S., 2005. Overexpression of glutaredoxin 2 attenuates apoptosis by preventing cytochrome c release. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 327, 774–779. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.067>
- Evans, R., O'Neill, M., Pritzel, A., Antropova, N., Senior, A., Green, T., Židek, A., Bates, R., Blackwell, S., Yim, J., Ronneberger, O., Bodenstein, S., Zielinski, M., Bridgland, A., Potapenko, A., Cowie, A., Tunyasuvunakool, K., Jain, R., Clancy, E., Kohli, P., Jumper, J., Hassabis, D., 2021. Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer (preprint). *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1101/2021.10.04.463034>
- Falekun, S., Sepulveda, J., Jami-Alahmadi, Y., Park, H., Wohlschlegel, J.A., Sigala, P.A., 2021. Divergent acyl carrier protein decouples mitochondrial Fe-S cluster biogenesis from fatty acid synthesis in malaria parasites. *eLife* 10, e71636. <https://doi.org/10.7554/eLife.71636>
- Fares, A., Rossignol, M., Peltier, J.-B., 2011. Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 416, 331–336. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.036>

- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B.-W., Wang, Y., Pallas, J.A., Loake, G.J., 2005. A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8054–8059. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501456102>
- Feng, Y., Zhong, N., Rouhier, N., Hase, T., Kusunoki, M., Jacquot, J.-P., Jin, C., Xia, B., 2006. Structural Insight into Poplar Glutaredoxin C1 with a Bridging Iron–Sulfur Cluster at the Active Site <sup>†</sup>. *Biochemistry* 45, 7998–8008. <https://doi.org/10.1021/bi060444t>
- Fernandes, A.P., Fladvad, M., Berndt, C., Andréßen, C., Lillig, C.H., Neubauer, P., Sunnerhagen, M., Holmgren, A., Vlamis-Gardikas, A., 2005. A Novel Monothiol Glutaredoxin (Grx4) from *Escherichia coli* Can Serve as a Substrate for Thioredoxin Reductase. *Journal of Biological Chemistry* 280, 24544–24552. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500678200>
- Finkemeier, I., Goodman, M., Lamkemeyer, P., Kandlbinder, A., Sweetlove, L.J., Dietz, K.-J., 2005. The Mitochondrial Type II Peroxiredoxin F Is Essential for Redox Homeostasis and Root Growth of *Arabidopsis thaliana* under Stress. *Journal of Biological Chemistry* 280, 12168–12180. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413189200>
- Foloppe, N., Nilsson, L., 2007. Stabilization of the Catalytic Thiolate in a Mammalian Glutaredoxin: Structure, Dynamics and Electrostatics of Reduced Pig Glutaredoxin and its Mutants. *Journal of Molecular Biology* 372, 798–816. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.101>
- Foloppe, N., Nilsson, L., 2004. The Glutaredoxin -C-P-Y-C- Motif: Influence of Peripheral Residues. *Structure* 12, 289–300. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.01.009>
- Fourcroy, P., Tissot, N., Gaymard, F., Briat, J.-F., Dubos, C., 2016. Facilitated Fe Nutrition by Phenolic Compounds Excreted by the *Arabidopsis* ABCG37/PDR9 Transporter Requires the IRT1/FRO2 High-Affinity Root Fe <sup>2+</sup> Transport System. *Molecular Plant* 9, 485–488. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.010>
- Fox, N.G., Martelli, A., Nabhan, J.F., Janz, J., Borkowska, O., Bulawa, C., Yue, W.W., 2018. Zinc(II) binding on human wild-type ISCU and Met140 variants modulates NFS1 desulfurase activity. *Biochimie* 152, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.012>
- Fox, N.G., Yu, X., Feng, X., Bailey, H.J., Martelli, A., Nabhan, J.F., Strain-Damerell, C., Bulawa, C., Yue, W.W., Han, S., 2019. Structure of the human frataxin-bound iron-sulfur cluster assembly complex provides insight into its activation mechanism. *Nat Commun* 10, 2210. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09989-y>
- Freibert, S.-A., Boniecki, M.T., Stümpfig, C., Schulz, V., Krapoth, N., Winge, D.R., Mühlhoff, U., Stehling, O., Cygler, M., Lill, R., 2021. N-terminal tyrosine of ISCU2 triggers [2Fe-2S] cluster synthesis by ISCU2 dimerization. *Nat Commun* 12, 6902. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27122-w>
- Frungillo, L., de Oliveira, J.F.P., Saviani, E.E., Oliveira, H.C., Martínez, M.C., Salgado, I., 2013. Modulation of mitochondrial activity by S-nitrosoglutathione reductase in *Arabidopsis thaliana* transgenic cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1827, 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.11.011>
- Fuchs, P., Rugen, N., Carrie, C., Elsässer, M., Finkemeier, I., Giese, J., Hildebrandt, T.M., Kühn, K., Maurino, V.G., Ruberti, C., Schallenberg-Rüdinger, M., Steinbeck, J., Braun, H., Eubel, H., Meyer, E.H., Müller-Schüssele, S.J., Schwarzländer, M., 2020. Single organelle function and organization as estimated from *Arabidopsis* mitochondrial proteomics. *Plant J* 101, 420–441. <https://doi.org/10.1111/tpj.14534>
- Gama, F., Bréhélin, C., Gelhaye, E., Meyer, Y., Jacquot, J.-P., Rey, P., Rouhier, N., 2008. Functional analysis and expression characteristics of chloroplastic Prx IIE. *Physiol Plant* 133, 599–610. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01097.x>
- Gama, F., Keech, O., Eymery, F., Finkemeier, I., Gelhaye, E., Gardeström, P., Dietz, K.J., Rey, P., Jacquot, J.-P., Rouhier, N., 2007. The mitochondrial type II peroxiredoxin from poplar. *Physiol Plant* 129, 196–206. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00785.x>



- Gelhaye, E., Rouhier, N., Gérard, J., Jolivet, Y., Gualberto, J., Navrot, N., Ohlsson, P.-I., Wingsle, G., Hirasawa, M., Knaff, D.B., Wang, H., Dizengremel, P., Meyer, Y., Jacquot, J.-P., 2004. A specific form of thioredoxin *h* occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 14545–14550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405282101>
- Gelhaye, E., Rouhier, N., Jacquot, J.-P., 2003. Evidence for a subgroup of thioredoxin *h* that requires GSH/Grx for its reduction. *FEBS Letters* 555, 443–448. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01301-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01301-2)
- Gervason, S., Larkem, D., Mansour, A.B., Botzanowski, T., Müller, C.S., Pecqueur, L., Le Pavec, G., Delaunay-Moisan, A., Brun, O., Agramunt, J., Grandas, A., Fontecave, M., Schünemann, V., Cianféroni, S., Sizun, C., Tolédano, M.B., D’Autréaux, B., 2019. Physiologically relevant reconstitution of iron-sulfur cluster biosynthesis uncovers persulfide-processing functions of ferredoxin-2 and frataxin. *Nat Commun* 10, 3566. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11470-9>
- Gollhofer, J., Schläwicke, C., Jungnick, N., Schmidt, W., Buckhout, T.J., 2011. Members of a small family of nodulin-like genes are regulated under iron deficiency in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.02.011>
- Grauschopf, U., Winther, J.R., Korber, P., Zander, T., Dallinger, P., Bardwell, J.C.A., 1995. Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst? *Cell* 83, 947–955. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90210-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90210-4)
- Gupta, K.J., Igamberdiev, A.U., 2011. The anoxic plant mitochondrion as a nitrite: NO reductase. *Mitochondrion* 11, 537–543. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.03.005>
- Gustin, J.L., Zanis, M.J., Salt, D.E., 2011. Structure and evolution of the plant cation diffusion facilitator family of ion transporters. *BMC Evol Biol* 11, 76. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-76>
- Haack, T.B., Rolinski, B., Haberberger, B., Zimmermann, F., Schum, J., Strecker, V., Graf, E., Athing, U., Hoppen, T., Wittig, I., Sperl, W., Freisinger, P., Mayr, J.A., Strom, T.M., Meitinger, T., Prokisch, H., 2013. Homozygous missense mutation in *BOLA3* causes multiple mitochondrial dysfunctions syndrome in two siblings. *J of Inher Metab Disea* 36, 55–62. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9489-7>
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* 219, 1–14. <https://doi.org/10.1042/bj2190001>
- Hanschmann, E.-M., Lönn, M.E., Schütte, L.D., Funke, M., Godoy, J.R., Eitner, S., Hudemann, C., Lillig, C.H., 2010. Both Thioredoxin 2 and Glutaredoxin 2 Contribute to the Reduction of the Mitochondrial 2-Cys Peroxiredoxin Prx3. *Journal of Biological Chemistry* 285, 40699–40705. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.185827>
- Hasse, D., Andersson, E., Carlsson, G., Maslobov, A., Hagemann, M., Bauwe, H., Andersson, I., 2013. Structure of the Homodimeric Glycine Decarboxylase P-protein from *Synechocystis* sp. PCC 6803 Suggests a Mechanism for Redox Regulation. *Journal of Biological Chemistry* 288, 35333–35345. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.509976>
- Hendricks, A.L., Wachnowsky, C., Fries, B., Fidai, I., Cowan, J.A., 2021. Characterization and Reconstitution of Human Lipoyl Synthase (LIAS) Supports ISCA2 and ISCU as Primary Cluster Donors and an Ordered Mechanism of Cluster Assembly. *IJMS* 22, 1598. <https://doi.org/10.3390/ijms22041598>
- Hennecke, J., Spleiss, C., Glockshuber, R., 1997. Influence of Acidic Residues and the Kink in the Active-site Helix on the Properties of the Disulfide Oxidoreductase DsbA. *Journal of Biological Chemistry* 272, 189–195. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.1.189>
- Hickok, J.R., Sahni, S., Shen, H., Arvind, A., Antoniou, C., Fung, L.W.M., Thomas, D.D., 2011. Dinitrosyliron complexes are the most abundant nitric oxide-derived cellular adduct: biological parameters of assembly and disappearance. *Free Radical Biology and Medicine* 51, 1558–1566. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.030>

- Higuchi, K., Watanabe, S., Takahashi, M., Kawasaki, S., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K., Mori, S., 2001. Nicotianamine synthase gene expression differs in barley and rice under Fe-deficient conditions. *Plant J* 25, 159–167. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.00951.x>
- Ho, B., Baryshnikova, A., Brown, G.W., 2018. Unification of Protein Abundance Datasets Yields a Quantitative *Saccharomyces cerevisiae* Proteome. *Cell Systems* 6, 192–205.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.12.004>
- Hossain, M.F., Bodnar, Y., Klein, C., Salas, C.O., Arnér, E.S.J., Gellert, M., Lillig, C.H., 2021. Molecular Basis for the Interactions of Human Thioredoxins with Their Respective Reductases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2021, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2021/6621292>
- Hou, L.-Y., Lehmann, M., Geigenberger, P., 2021. Thioredoxin h2 and o1 Show Different Subcellular Localizations and Redox-Active Functions, and Are Extrachloroplastic Factors Influencing Photosynthetic Performance in Fluctuating Light. *Antioxidants* 10, 705. <https://doi.org/10.3390/antiox10050705>
- Hu, J., Huang, X., Chen, L., Sun, X., Lu, C., Zhang, L., Wang, Y., Zuo, J., 2015. Site-Specific Nitrosoproteomic Identification of Endogenously S-Nitrosylated Proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology* 167, 1731–1746. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00026>
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.-X., Yi, M., Zhao, Y., 2019. Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. *Front. Plant Sci.* 10, 800. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800>
- Huang, J., Willems, P., Wei, B., Tian, C., Ferreira, R.B., Bodra, N., Martínez Gache, S.A., Wahn, K., Liu, K., Vertommen, D., Gevaert, K., Carroll, K.S., Van Montagu, M., Yang, J., Van Breusegem, F., Messens, J., 2019. Mining for protein S-sulfenylation in *Arabidopsis* uncovers redox-sensitive sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 21256–21261. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906768116>
- Iannuzzi, C., Adrover, M., Puglisi, R., Yan, R., Temussi, P.A., Pastore, A., 2014. The role of zinc in the stability of the marginally stable IscU scaffold protein: The Stability Determinants of IscU. *Protein Science* 23, 1208–1219. <https://doi.org/10.1002/pro.2501>
- Iglesias-Baena, I., Barranco-Medina, S., Sevilla, F., Lázaro, J.-J., 2011. The Dual-Targeted Plant Sulfiredoxin Retroreduces the Sulfenic Form of Atypical Mitochondrial Peroxiredoxin. *Plant Physiology* 155, 944–955. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166504>
- Inoue, H., Higuchi, K., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N.K., 2003. Three rice nicotianamine synthase genes, OsNAS1, OsNAS2, and OsNAS3 are expressed in cells involved in long-distance transport of iron and differentially regulated by iron. *Plant J* 36, 366–381. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01878.x>
- Inoue, H., Kobayashi, T., Nozoye, T., Takahashi, M., Kakei, Y., Suzuki, K., Nakazono, M., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N.K., 2009. Rice OsYSL15 Is an Iron-regulated Iron(III)-Deoxymugineic Acid Transporter Expressed in the Roots and Is Essential for Iron Uptake in Early Growth of the Seedlings. *Journal of Biological Chemistry* 284, 3470–3479. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806042200>
- Invernici, M., Selvolini, G., Silva, J.M., Marrazza, G., Ciofi-Baffoni, S., Piccioli, M., 2022. Interconversion between [2Fe–2S] and [4Fe–4S] cluster glutathione complexes. *Chem. Commun.* 58, 3533–3536. <https://doi.org/10.1039/D1CC03566E>
- Jackson, C., Dench, J., Moore, A.L., Halliwell, B., Foyer, C.H., Hall, D.O., 1978. Subcellular Localisation and Identification of Superoxide Dismutase in the Leaves of Higher Plants. *Eur J Biochem* 91, 339–344. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1978.tb12685.x>
- Jacquot, J.-P., Rivera-Madrid, R., Marinho, P., Kollarova, M., Le Maréchal, P., Miginiac-Maslow, M., Meyer, Y., 1994. Arabidopsis thaliana NAPHP Thioredoxin Reductase. *Journal of Molecular Biology* 235, 1357–1363. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1091>

- Jain, A., Dashner, Z.S., Connolly, E.L., 2019. Mitochondrial Iron Transporters (MIT1 and MIT2) Are Essential for Iron Homeostasis and Embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 10, 1449. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01449>
- Jain, A., Wilson, G.T., Connolly, E.L., 2014. The diverse roles of FRO family metalloreductases in iron and copper homeostasis. *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00100>
- Jeong, J., Cohu, C., Kerkeb, L., Pilon, M., Connolly, E.L., Guerinot, M.L., 2008. Chloroplast Fe(III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 10619–10624. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708367105>
- Jeong, J., Connolly, E.L., 2009. Iron uptake mechanisms in plants: Functions of the FRO family of ferric reductases. *Plant Science* 176, 709–714. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.02.011>
- Jimenez, A., Hernandez, J.A., del Rio, L.A., Sevilla, F., 1997. Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves. *Plant Physiol.* 114, 275–284. <https://doi.org/10.1104/pp.114.1.275>
- Johansson, C., Lillig, C.H., Holmgren, A., 2004. Human Mitochondrial Glutaredoxin Reduces S-Glutathionylated Proteins with High Affinity Accepting Electrons from Either Glutathione or Thioredoxin Reductase. *Journal of Biological Chemistry* 279, 7537–7543. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312719200>
- Keech, O., Dizengremel, P., Gardeström, P., 2005. Preparation of leaf mitochondria from *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 124, 403–409. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00521.x>
- Kim, L.J., Tsuyuki, K.M., Hu, F., Park, E.Y., Zhang, J., Iraheta, J.G., Chia, J., Huang, R., Tucker, A.E., Clyne, M., Castellano, C., Kim, A., Chung, D.D., DaVeiga, C.T., Parsons, E.M., Vatamaniuk, O.K., Jeong, J., 2021. Ferroportin 3 is a dual-targeted mitochondrial/chloroplast iron exporter necessary for iron homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant J* 107, 215–236. <https://doi.org/10.1111/tpj.15286>
- Kim, S.A., Punshon, T., Lanzirotti, A., Li, L., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Kaplan, J., Guerinot, M.L., 2006. Localization of Iron in *Arabidopsis* Seed Requires the Vacuolar Membrane Transporter VIT1. *Science* 314, 1295–1298. <https://doi.org/10.1126/science.1132563>
- Kneeshaw, S., Gelineau, S., Tada, Y., Loake, G.J., Spoel, S.H., 2014. Selective Protein Denitrosylation Activity of Thioredoxin-h5 Modulates Plant Immunity. *Molecular Cell* 56, 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.003>
- Kobayashi, T., Nakanishi Itai, R., Nishizawa, N.K., 2014. Iron deficiency responses in rice roots. *Rice* 7, 27. <https://doi.org/10.1186/s12284-014-0027-0>
- Koh, C.S., Navrot, N., Didierjean, C., Rouhier, N., Hirasawa, M., Knaff, D.B., Wingsle, G., Samian, R., Jacquot, J.-P., Corbier, C., Gelhaye, E., 2008. An Atypical Catalytic Mechanism Involving Three Cysteines of Thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry* 283, 23062–23072. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802093200>
- Laloi, C., Rayapuram, N., Chartier, Y., Grienenberger, J.-M., Bonnard, G., Meyer, Y., 2001. Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 14144–14149. <https://doi.org/10.1073/pnas.241340898>
- Lanquar, V., Lelièvre, F., Bolte, S., Hamès, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schröder, A., Krämer, U., Barbier-Brygoo, H., Thomine, S., 2005. Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron: Iron mobilization during seed germination. *The EMBO Journal* 24, 4041–4051. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600864>
- Larosa, V., Remacle, C., 2018. Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Bioscience Reports* 38, BSR20171492. <https://doi.org/10.1042/BSR20171492>

- Leadern, L., Busi, M.V., Gomez-Casati, D.F., 2014. The mitochondrial proteins AtHscB and AtIsu1 involved in Fe–S cluster assembly interact with the Hsp70-type chaperon AtHscA2 and modulate its catalytic activity. *Mitochondrion* 19, 375–381. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.11.002>
- Lee, U., Wie, C., Fernandez, B.O., Feelisch, M., Vierling, E., 2008. Modulation of Nitrosative Stress by *S*-Nitrosoglutathione Reductase Is Critical for Thermotolerance and Plant Growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20, 786–802. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052647>
- Lehnert, N., Kim, E., Dong, H.T., Harland, J.B., Hunt, A.P., Manickas, E.C., Oakley, K.M., Pham, J., Reed, G.C., Alfaro, V.S., 2021. The Biologically Relevant Coordination Chemistry of Iron and Nitric Oxide: Electronic Structure and Reactivity. *Chem. Rev.* 121, 14682–14905. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00253>
- Lepka, K., Volbracht, K., Bill, E., Schneider, R., Rios, N., Hildebrandt, T., Ingwersen, J., Prozorovski, T., Lillig, C.H., van Horssen, J., Steinman, L., Hartung, H.-P., Radi, R., Holmgren, A., Aktas, O., Berndt, C., 2017. Iron-sulfur glutaredoxin 2 protects oligodendrocytes against damage induced by nitric oxide release from activated microglia: LEPKA et al. *Glia* 65, 1521–1534. <https://doi.org/10.1002/glia.23178>
- Li, H., Mapolelo, D.T., Dingra, N.N., Keller, G., Riggs-Gelasco, P.J., Winge, D.R., Johnson, M.K., Outten, C.E., 2011. Histidine 103 in Fra2 Is an Iron-Sulfur Cluster Ligand in the [2Fe-2S] Fra2-Grx3 Complex and Is Required for in Vivo Iron Signaling in Yeast. *Journal of Biological Chemistry* 286, 867–876. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.184176>
- Li, H., Mapolelo, D.T., Dingra, N.N., Naik, S.G., Lees, N.S., Hoffman, B.M., Riggs-Gelasco, P.J., Huynh, B.H., Johnson, M.K., Outten, C.E., 2009. The Yeast Iron Regulatory Proteins Grx3/4 and Fra2 Form Heterodimeric Complexes Containing a [2Fe-2S] Cluster with Cysteinyl and Histidyl Ligation. *Biochemistry* 48, 9569–9581. <https://doi.org/10.1021/bi901182w>
- Li, H., Mapolelo, D.T., Randeniya, S., Johnson, M.K., Outten, C.E., 2012. Human Glutaredoxin 3 Forms [2Fe-2S]-Bridged Complexes with Human BolA2. *Biochemistry* 51, 1687–1696. <https://doi.org/10.1021/bi2019089>
- Li, L.-Y., Cai, Q.-Y., Yu, D.-S., Guo, C.-H., 2011. Overexpression of AtFRO6 in transgenic tobacco enhances ferric chelate reductase activity in leaves and increases tolerance to iron-deficiency chlorosis. *Mol Biol Rep* 38, 3605–3613. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0472-9>
- Liedgens, L., Zimmermann, J., Wäschenbach, L., Geissel, F., Laporte, H., Gohlke, H., Morgan, B., Deponte, M., 2020. Quantitative assessment of the determinant structural differences between redox-active and inactive glutaredoxins. *Nat Commun* 11, 1725. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15441-3>
- Lillig, C.H., Berndt, C., Vergnolle, O., Lönn, M.E., Hudemann, C., Bill, E., Holmgren, A., 2005. Characterization of human glutaredoxin 2 as iron–sulfur protein: A possible role as redox sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8168–8173. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500735102>
- Lin, C.-W., McCabe, J.W., Russell, D.H., Barondeau, D.P., 2020. Molecular Mechanism of ISC Iron–Sulfur Cluster Biogenesis Revealed by High-Resolution Native Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* 142, 6018–6029. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b11454>
- Lindermayr, C., 2018. Crosstalk between reactive oxygen species and nitric oxide in plants: Key role of *S*-nitrosoglutathione reductase. *Free Radical Biology and Medicine* 122, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.027>
- Lindermayr, C., Saalbach, G., Durner, J., 2005. Proteomic Identification of *S*-Nitrosylated Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 137, 921–930. <https://doi.org/10.1104/pp.104.058719>
- Lönnerdal, B., 2009. Soybean ferritin: implications for iron status of vegetarians. *The American Journal of Clinical Nutrition* 89, 1680S–1685S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.26736W>

- Maillard, A., DiquÃ©lou, S., Billard, V., LaÃ©nÃ©, P., Garnica, M., Prudent, M., Garcia-Mina, J.-M., Yvin, J.-C., Ourry, A., 2015. Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency. *Front. Plant Sci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00317>
- Mailloux, R.J., Craig Ayre, D., Christian, S.L., 2016. Induction of mitochondrial reactive oxygen species production by GSH mediated S-glutathionylation of 2-oxoglutarate dehydrogenase. *Redox Biology* 8, 285–297. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.02.002>
- Mailloux, R.J., Xuan, J.Y., McBride, S., Maharsy, W., Thorn, S., Holterman, C.E., Kennedy, C.R.J., Rippstein, P., deKemp, R., da Silva, J., Nemer, M., Lou, M., Harper, M.-E., 2014. Glutaredoxin-2 Is Required to Control Oxidative Phosphorylation in Cardiac Muscle by Mediating Deglutathionylation Reactions. *Journal of Biological Chemistry* 289, 14812–14828. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.550574>
- Manta, B., Pavan, C., Sturlese, M., Medeiros, A., Crispo, M., Berndt, C., Krauth-Siegel, R.L., Bellanda, M., Comini, M.A., 2013. Iron–Sulfur Cluster Binding by Mitochondrial Monothiol Glutaredoxin-1 of *Trypanosoma brucei*: Molecular Basis of Iron–Sulfur Cluster Coordination and Relevance for Parasite Infectivity. *Antioxidants & Redox Signaling* 19, 665–682. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4859>
- Martí, M.C., Olmos, E., Calvete, J.J., Díaz, I., Barranco-Medina, S., Whelan, J., Lázaro, J.J., Sevilla, F., Jiménez, A., 2009. Mitochondrial and Nuclear Localization of a Novel Pea Thioredoxin: Identification of Its Mitochondrial Target Proteins. *Plant Physiology* 150, 646–657. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138073>
- Martin, J.L., 1995. Thioredoxin —a fold for all reasons. *Structure* 3, 245–250. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00154-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00154-X)
- Martín-Barranco, A., Spielmann, J., Dubeaux, G., Vert, G., Zelazny, E., 2020. Dynamic Control of the High-Affinity Iron Uptake Complex in Root Epidermal Cells. *Plant Physiol.* 184, 1236–1250. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00234>
- Marty, L., Bausewein, D., Müller, C., Bangash, S.A.K., Moseler, A., Schwarzländer, M., Müller-Schüssele, S.J., Zechmann, B., Riondet, C., Balk, J., Wirtz, M., Hell, R., Reichheld, J., Meyer, A.J., 2019. Arabidopsis glutathione reductase 2 is indispensable in plastids, while mitochondrial glutathione is safeguarded by additional reduction and transport systems. *New Phytol* 224, 1569–1584. <https://doi.org/10.1111/nph.16086>
- McCarthy, E.L., Booker, S.J., 2017. Destruction and reformation of an iron-sulfur cluster during catalysis by lipoyl synthase. *Science* 358, 373–377. <https://doi.org/10.1126/science.aan4574>
- McCarthy, E.L., Rankin, A.N., Dill, Z.R., Booker, S.J., 2019. The A-type domain in *Escherichia coli* NfuA is required for regenerating the auxiliary [4Fe–4S] cluster in *Escherichia coli* lipoyl synthase. *Journal of Biological Chemistry* 294, 1609–1617. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006171>
- McLain, A.L., Cormier, P.J., Kinter, M., Szweda, L.I., 2013. Glutathionylation of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase: The chemical nature and relative susceptibility of the cofactor lipoic acid to modification. *Free Radical Biology and Medicine* 61, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.020>
- Melber, A., Na, U., Vashisht, A., Weiler, B.D., Lill, R., Wohlschlegel, J.A., Winge, D.R., 2016. Role of Nfu1 and Bol3 in iron-sulfur cluster transfer to mitochondrial clients. *eLife* 5, e15991. <https://doi.org/10.7554/eLife.15991>
- Meyer, A.J., Brach, T., Marty, L., Kreye, S., Rouhier, N., Jacquot, J.-P., Hell, R., 2007. Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *The Plant Journal* 52, 973–986. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03280.x>
- Meyer, Y., Belin, C., Delorme-Hinoux, V., Reichheld, J.-P., Riondet, C., 2012. Thioredoxin and Glutaredoxin Systems in Plants: Molecular Mechanisms, Crosstalks, and Functional

- Molik, S., Lill, R., Mühlhoff, U., 2007. Methods for Studying Iron Metabolism in Yeast Mitochondria, in: *Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp. 261–280. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(06\)80013-0](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(06)80013-0)
- Molina-Navarro, M.M., Casas, C., Piedrafita, L., Bellí, G., Herrero, E., 2006. Prokaryotic and eukaryotic monothiol glutaredoxins are able to perform the functions of Grx5 in the biogenesis of Fe/S clusters in yeast mitochondria. *FEBS Letters* 580, 2273–2280. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.037>
- Møller, I.M., Igamberdiev, A.U., Bykova, N.V., Finkemeier, I., Rasmusson, A.G., Schwarzländer, M., 2020. Matrix Redox Physiology Governs the Regulation of Plant Mitochondrial Metabolism through Posttranslational Protein Modifications. *Plant Cell* 32, 573–594. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00535>
- Moore, A.L., Dench, J.E., Jackson, C., Hall, D.O., 1980. Glycine decarboxylase activity in plant tissues measured by a rapid assay technique. *FEBS Letters* 115, 54–58. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(80\)80725-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(80)80725-3)
- Morrissey, J., Baxter, I.R., Lee, J., Li, L., Lahner, B., Grotz, N., Kaplan, J., Salt, D.E., Gueriot, M.L., 2009. The Ferroportin Metal Efflux Proteins Function in Iron and Cobalt Homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21, 3326–3338. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069401>
- Moseler, A., 2017. Functional characterisation of glutaredoxin S15 from *Arabidopsis thaliana* (Dissertation oder Habilitation). Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Bonn.
- Moseler, A., Aller, I., Wagner, S., Nietzel, T., Przybyla-Toscano, J., Mühlhoff, U., Lill, R., Berndt, C., Rouhier, N., Schwarzländer, M., Meyer, A.J., 2015. The mitochondrial monothiol glutaredoxin S15 is essential for iron-sulfur protein maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 13735–13740. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510835112>
- Moseler, A., Kruse, I., Maclean, A.E., Pedroletti, L., Franceschetti, M., Wagner, S., Wehler, R., Fischer-Schrader, K., Poschet, G., Wirtz, M., Dörmann, P., Hildebrandt, T.M., Hell, R., Schwarzländer, M., Balk, J., Meyer, A.J., 2021. The function of glutaredoxin GRXS15 is required for lipoyl-dependent dehydrogenases in mitochondria. *Plant Physiology* 186, 1507–1525. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab172>
- Murata, Y., Ma, J.F., Yamaji, N., Ueno, D., Nomoto, K., Iwashita, T., 2006. A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots. *The Plant Journal* 46, 563–572. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02714.x>
- Nasta, V., Giachetti, A., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L., 2017. Structural insights into the molecular function of human [2Fe-2S] BOLA1-GRX5 and [2Fe-2S] BOLA3-GRX5 complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1861, 2119–2131. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.05.005>
- Nasta, V., Suraci, D., Gourdupis, S., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L., 2020. A pathway for assembling [4Fe-4S]<sup>2+</sup> clusters in mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis. *FEBS J* 287, 2312–2327. <https://doi.org/10.1111/febs.15140>
- Navarro-Sastre, A., Tort, F., Stehling, O., Uzarska, M.A., Arranz, J.A., del Toro, M., Labayru, M.T., Landa, J., Font, A., Garcia-Villoria, J., Merinero, B., Ugarte, M., Gutierrez-Solana, L.G., Campistol, J., Garcia-Cazorla, A., Vaquerizo, J., Riudor, E., Briones, P., Elpeleg, O., Ribes, A., Lill, R., 2011. A Fatal Mitochondrial Disease Is Associated with Defective NFU1 Function in the Maturation of a Subset of Mitochondrial Fe-S Proteins. *The American Journal of Human Genetics* 89, 656–667. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.10.005>
- Navrot, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Rey, P., Knaff, D.B., Issakidis, E., Jacquot, J.-P., Rouhier, N., 2006. Plant Glutathione Peroxidases Are Functional Peroxiredoxins

- Distributed in Several Subcellular Compartments and Regulated during Biotic and Abiotic Stresses. *Plant Physiology* 142, 1364–1379. <https://doi.org/10.1104/pp.106.089458>
- Niazi, A.K., Bariat, L., Riondet, C., Carapito, C., Mhamdi, A., Noctor, G., Reichheld, J.-P., 2019. Cytosolic Isocitrate Dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* Is Regulated by Glutathionylation. *Antioxidants* 8, 16. <https://doi.org/10.3390/antiox8010016>
- Niehaus, M., Straube, H., Künzler, P., Rugen, N., Hegermann, J., Giavalisco, P., Eubel, H., Witte, C.-P., Herde, M., 2020. Rapid Affinity Purification of Tagged Plant Mitochondria (Mito-AP) for Metabolome and Proteome Analyses. *Plant Physiol.* 182, 1194–1210. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00736>
- Nietzel, T., Mostertz, J., Ruberti, C., Née, G., Fuchs, P., Wagner, S., Moseler, A., Müller-Schüssele, S.J., Benamar, A., Poschet, G., Büttner, M., Møller, I.M., Lillig, C.H., Macherel, D., Wirtz, M., Hell, R., Finkemeier, I., Meyer, A.J., Hochgräfe, F., Schwarzländer, M., 2020. Redox-mediated kick-start of mitochondrial energy metabolism drives resource-efficient seed germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 741–751. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910501117>
- Nozoye, T., Nagasaka, S., Kobayashi, T., Takahashi, M., Sato, Yuki, Sato, Yoko, Uozumi, N., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K., 2011. Phytosiderophore Efflux Transporters Are Crucial for Iron Acquisition in Gramineous Plants. *Journal of Biological Chemistry* 286, 5446–5454. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.180026>
- O'Brien, M., Chalker, J., Slade, L., Gardiner, D., Mailloux, R.J., 2017. Protein S-glutathionylation alters superoxide/hydrogen peroxide emission from pyruvate dehydrogenase complex. *Free Radical Biology and Medicine* 106, 302–314. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.046>
- Ohwaki, Y., Sugahara, K., 1997. Active extrusion of protons and exudation of carboxylic acids in response to iron deficiency by roots of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant and Soil* 189, 49–55. <https://doi.org/10.1023/A:1004271108351>
- Passaia, G., Spagnolo Fonini, L., Caverzan, A., Jardim-Messeder, D., Christoff, A.P., Gaeta, M.L., de Araujo Mariath, J.E., Margis, R., Margis-Pinheiro, M., 2013. The mitochondrial glutathione peroxidase GPX3 is essential for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> homeostasis and root and shoot development in rice. *Plant Science* 208, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.03.017>
- Pérez-Pérez, M.E., Mauriès, A., Maes, A., Tourasse, N.J., Hamon, M., Lemaire, S.D., Marchand, C.H., 2017. The Deep Thioredoxome in *Chlamydomonas reinhardtii*: New Insights into Redox Regulation. *Molecular Plant* 10, 1107–1125. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.009>
- Petit, J.-M., Briat, J.-F., Lobreáux, S., 2001. Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* ferritin gene family. *Biochemical Journal* 359, 575–582. <https://doi.org/10.1042/bj3590575>
- Pottier, M., Dumont, J., Masclaux-Daubresse, C., Thomine, S., 2018. Autophagy is essential for optimal translocation of iron to seeds in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery388>
- Przybyla-Toscano, J., 2017. Étude des protéines NFU, ISCA et FDX, impliquées dans la maturation des centres fer-soufre dans les mitochondries d'*Arabidopsis thaliana*. Université de Lorraine, IAM - Interactions Arbres-Microorganismes.
- Przybyla-Toscano, J., Christ, L., Keech, O., Rouhier, N., 2021. Iron-sulfur proteins in plant mitochondria: roles and maturation. *Journal of Experimental Botany* 72, 2014–2044. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa578>
- Przybyla-Toscano, J., Maclean, A.E., Franceschetti, M., Liebsch, D., Vignols, F., Keech, O., Rouhier, N., Balk, J., 2022. Protein lipoylation in mitochondria requires Fe-S cluster assembly factors NFU4 and NFU5. *Plant Physiology* 188, 997–1013. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab501>
- Pulido, P., Spínola, M.C., Kirchsteiger, K., Guinea, M., Pascual, M.B., Sahrawy, M., Sandalio, L.M., Dietz, K.-J., González, M., Cejudo, F.J., 2010. Functional analysis of the pathways for 2-Cys

- peroxiredoxin reduction in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Journal of Experimental Botany* 61, 4043–4054. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq218>
- Ramelot, T.A., Cort, J.R., Goldsmith-Fischman, S., Kornhaber, G.J., Xiao, R., Shastry, R., Acton, T.B., Honig, B., Montelione, G.T., Kennedy, M.A., 2004. Solution NMR Structure of the Iron–Sulfur Cluster Assembly Protein U (IscU) with Zinc Bound at the Active Site. *Journal of Molecular Biology* 344, 567–583. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.038>
- Rasmusson, A.G., Wallström, S.V., 2010. Involvement of mitochondria in the control of plant cell NAD(P)H reduction levels. *Biochemical Society Transactions* 38, 661–666. <https://doi.org/10.1042/BST0380661>
- Reichheld, J.-P., Khafif, M., Riondet, C., Droux, M., Bonnard, G., Meyer, Y., 2007. Inactivation of Thioredoxin Reductases Reveals a Complex Interplay between Thioredoxin and Glutathione Pathways in *Arabidopsis* Development. *The Plant Cell* 19, 1851–1865. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.050849>
- Reichheld, J.-P., Meyer, E., Khafif, M., Bonnard, G., Meyer, Y., 2005. AtNTRB is the major mitochondrial thioredoxin reductase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 579, 337–342. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.094>
- Reinholdt, O., Schwab, S., Zhang, Y., Reichheld, J.-P., Fernie, A.R., Hagemann, M., Timm, S., 2019. Redox-Regulation of Photorespiration through Mitochondrial Thioredoxin o1. *Plant Physiol.* 181, 442–457. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00559>
- Rellán-Álvarez, R., Giner-Martínez-Sierra, J., Orduna, J., Orera, I., Rodríguez-Castrillón, J.Á., García-Alonso, J.I., Abadía, J., Álvarez-Fernández, A., 2010. Identification of a Tri-Iron(III), Tri-Citrate Complex in the Xylem Sap of Iron-Deficient Tomato Resupplied with Iron: New Insights into Plant Iron Long-Distance Transport. *Plant and Cell Physiology* 51, 91–102. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp170>
- Ren, X., Sengupta, R., Lu, J., Lundberg, J.O., Holmgren, A., 2019. Characterization of mammalian glutaredoxin isoforms as S-denitrosylases. *FEBS Lett* 593, 1799–1806. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13454>
- Robe, K., Conejero, G., Gao, F., Lefebvre-Legendre, L., Sylvestre-Gonon, E., Rofidal, V., Hem, S., Rouhier, N., Barberon, M., Hecker, A., Gaymard, F., Izquierdo, E., Dubos, C., 2021. Coumarin accumulation and trafficking in *Arabidopsis thaliana*: a complex and dynamic process. *New Phytol* 229, 2062–2079. <https://doi.org/10.1111/nph.17090>
- Robinson, N.J., Procter, C.M., Connolly, E.L., Guerinot, M.L., 1999. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397, 694–697. <https://doi.org/10.1038/17800>
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., Kaiser, W.M., 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Botany* 53, 103–110. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.366.103>
- Rodríguez-Manzanares, M.T., Ros, J., Cabisco, E., Sorribas, A., Herrero, E., 1999. Grx5 Glutaredoxin Plays a Central Role in Protection against Protein Oxidative Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 8180–8190. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.12.8180>
- Rodríguez-Manzanares, M.T., Tamarit, J., Bellí, G., Ros, J., Herrero, E., 2002. Grx5 Is a Mitochondrial Glutaredoxin Required for the Activity of Iron/Sulfur Enzymes. *MBoC* 13, 1109–1121. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-10-0517>
- Romera, F.J., Alcantara, E., Diaz de la Guardia, M., 1997. Influence of bicarbonate and metal ions on the development of root Fe(III) reducing capacity by Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Physiol Plant* 101, 143–148. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1010119.x>
- Romero-Puertas, M.C., Campostrini, N., Mattè, A., Righetti, P.G., Perazzolli, M., Zolla, L., Roepstorff, P., Delledonne, M., 2008. Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana*



- undergoing hypersensitive response. *Proteomics* 8, 1459–1469. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700536>
- Roos, G., Foloppe, N., Messens, J., 2013. Understanding the p  $K_a$  of Redox Cysteines: The Key Role of Hydrogen Bonding. *Antioxidants & Redox Signaling* 18, 94–127. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4521>
- Roos, G., Loverix, S., Geerlings, P., 2006. Origin of the p  $K_a$  Perturbation of N-Terminal Cysteine in  $\alpha$ - and  $3_{10}$ -Helices: A Computational DFT Study. *J. Phys. Chem. B* 110, 557–562. <https://doi.org/10.1021/jp0549780>
- Roos, G., Van Laer, K., Wyns, L., Foloppe, N., Nilsson, L., Geerlings, P., Messens, J., 2009. How Thioredoxin Dissociates Its Mixed Disulfide. *PLoS Comput Biol* 5, e1000461. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000461>
- Roret, T., Tsan, P., Couturier, J., Zhang, B., Johnson, M.K., Rouhier, N., Didierjean, C., 2014. Structural and Spectroscopic Insights into BolA-Glutaredoxin Complexes. *J. Biol. Chem.* 289, 24588–24598. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.572701>
- Roschttardt, H., Conéjéro, G., Curie, C., Mari, S., 2009. Identification of the Endodermal Vacuole as the Iron Storage Compartment in the Arabidopsis Embryo. *Plant Physiol.* 151, 1329–1338. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144444>
- Roschttardt, H., Conéjéro, G., Divol, F., Alcon, C., Verdeil, J.-L., Curie, C., Mari, S., 2013. New insights into Fe localization in plant tissues. *Front. Plant Sci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00350>
- Rouhier, N., Unno, H., Bandyopadhyay, S., Masip, L., Kim, S.-K., Hirasawa, M., Gualberto, J.M., Lattard, V., Kusunoki, M., Knaff, D.B., Georgiou, G., Hase, T., Johnson, M.K., Jacquot, J.-P., 2007. Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe–2S] cluster in poplar glutaredoxin C1. *PNAS* 104, 7379–7384. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702268104>
- Rouhier, N., Villarejo, A., Srivastava, M., Gelhaye, E., Keech, O., Droux, M., Finkemeier, I., Samuelsson, G., Dietz, K.J., Jacquot, J.-P., Wingsle, G., 2005. Identification of Plant Glutaredoxin Targets. *Antioxidants & Redox Signaling* 7, 919–929. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.919>
- Saha, B., Borovskii, G., Panda, S.K., 2016. Alternative oxidase and plant stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior* 11, e1256530. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1256530>
- Sakamoto, A., Ueda, M., Morikawa, H., 2002. *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Letters* 515, 20–24. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02414-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02414-6)
- Santi, S., Schmidt, W., 2009. Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in Arabidopsis roots. *New Phytologist* 183, 1072–1084. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02908.x>
- Santos, J.M., Freire, P., Vicente, M., Arraiano, C.M., 1999. The stationary-phase morphogene bolA from *Escherichia coli* is induced by stress during early stages of growth. *Mol Microbiol* 32, 789–798. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01397.x>
- Saudino, G., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L., 2022. Protein-Interaction Affinity Gradient Drives [4Fe–4S] Cluster Insertion in Human Lipoyl Synthase. *J. Am. Chem. Soc.* 144, 5713–5717. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c13626>
- Schertl, P., Braun, H.-P., 2014. Respiratory electron transfer pathways in plant mitochondria. *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00163>
- Schmidtman, E., König, A.-C., Orwat, A., Leister, D., Hartl, M., Finkemeier, I., 2014. Redox Regulation of Arabidopsis Mitochondrial Citrate Synthase. *Molecular Plant* 7, 156–169. <https://doi.org/10.1093/mp/sst144>

- Schulz, V., Basu, S., Freibert, S.-A., Webert, H., Boss, L., Mühlenhoff, U., Pierrel, F., Essen, L.-O., Warui, D.M., Booker, S.J., Stehling, O., Lill, R., 2022. Functional spectrum and specificity of mitochondrial ferredoxins FDX1 and FDX2. *Nat Chem Biol.* <https://doi.org/10.1038/s41589-022-01159-4>
- Schwarzländer, M., Fricker, M.D., Müller, C., Marty, L., Brach, T., Novak, J., Sweetlove, L.J., Hell, R., Meyer, A.J., 2008. Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *Journal of Microscopy* 231, 299–316. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2008.02030.x>
- Schwarzländer, M., Fricker, M.D., Sweetlove, L.J., 2009. Monitoring the in vivo redox state of plant mitochondria: Effect of respiratory inhibitors, abiotic stress and assessment of recovery from oxidative challenge. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787, 468–475. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.020>
- Sen, S., Bonfio, C., Mansy, S.S., Cowan, J.A., 2018. Investigation of glutathione-derived electrostatic and hydrogen-bonding interactions and their role in defining Grx5 [2Fe–2S] cluster optical spectra and transfer chemistry. *J Biol Inorg Chem* 23, 241–252. <https://doi.org/10.1007/s00775-017-1525-5>
- Shin, Jin Seok, So, W.M., Kim, S.Y., Noh, M., Hyoung, S., Yoo, K.S., Shin, Jeong Sheop, 2020. CBSX3-Trxo-2 regulates ROS generation of mitochondrial complex II (succinate dehydrogenase) in Arabidopsis. *Plant Science* 294, 110458. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110458>
- Solti, Á., Kovács, K., Basa, B., Vértes, A., Sárvári, É., Fodor, F., 2012. Uptake and incorporation of iron in sugar beet chloroplasts. *Plant Physiology and Biochemistry* 52, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.11.010>
- Srinivasa, S., Ding, X., Kast, J., 2015. Formaldehyde cross-linking and structural proteomics: Bridging the gap. *Methods* 89, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.05.006>
- Ströher, E., Grassl, J., Carrie, C., Fenske, R., Whelan, J., Millar, A.H., 2016. Glutaredoxin S15 Is Involved in Fe-S Cluster Transfer in Mitochondria Influencing Lipic Acid-Dependent Enzymes, Plant Growth, and Arsenic Tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 170, 1284–1299. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01308>
- Sturlese, M., Manta, B., Bertarello, A., Bonilla, M., Lelli, M., Zambelli, B., Grunberg, K., Mammi, S., Comini, M.A., Bellanda, M., 2018. The lineage-specific, intrinsically disordered N-terminal extension of monothiol glutaredoxin 1 from trypanosomes contains a regulatory region. *Sci Rep* 8, 13716. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31817-4>
- Suraci, D., Saudino, G., Nasta, V., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L., 2021. ISCA1 Orchestrates ISCA2 and NFU1 in the Maturation of Human Mitochondrial [4Fe-4S] Proteins. *Journal of Molecular Biology* 433, 166924. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166924>
- Tamarit, J., Bellí, G., Cabisco, E., Herrero, E., Ros, J., 2003. Biochemical Characterization of Yeast Mitochondrial Grx5 Monothiol Glutaredoxin. *J. Biol. Chem.* 278, 25745–25751. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303477200>
- Tarantino, D., Santo, N., Morandini, P., Casagrande, F., Braun, H.-P., Heinemeyer, J., Vigani, G., Soave, C., Murgia, I., 2010. AtFer4 ferritin is a determinant of iron homeostasis in Arabidopsis thaliana heterotrophic cells. *Journal of Plant Physiology* 167, 1598–1605. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.06.020>
- Terry, N., Abadia, J., 1986. Function of iron in chloroplasts. *J. of Plant Nutrition* 9, 609–646. <https://doi.org/10.1080/01904168609363470>
- Thurlkill, R.L., Grimsley, G.R., Scholtz, J.M., Pace, C.N., 2006. pK values of the ionizable groups of proteins. *Protein Sci.* 15, 1214–1218. <https://doi.org/10.1110/ps.051840806>
- Tichá, T., Činčalová, L., Kopečný, D., Sedlářová, M., Kopečná, M., Luhová, L., Petřivalský, M., 2017. Characterization of S-nitrosoglutathione reductase from Brassica and Lactuca spp. and its

- modulation during plant development. *Nitric Oxide* 68, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.12.002>
- Tiwari, Santwana, Tiwari, Sanjesh, Singh, M., Singh, A., Prasad, S.M., 2017. Generation Mechanisms of Reactive Oxygen Species in the Plant Cell: An Overview, in: Singh, V.P., Singh, S., Tripathi, D.K., Prasad, S.M., Chauhan, D.K. (Eds.), *Reactive Oxygen Species in Plants*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 1–22. <https://doi.org/10.1002/9781119324928.ch1>
- Trnka, D., Engelke, A.D., Gellert, M., Moseler, A., Hossain, M.F., Lindenberg, T.T., Pedroletti, L., Odermatt, B., de Souza, J.V., Bronowska, A.K., Dick, T.P., Mühlhoff, U., Meyer, A.J., Berndt, C., Lillig, C.H., 2020. Molecular basis for the distinct functions of redox-active and FeS-transferring glutaredoxins. *Nat Commun* 11, 3445. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17323-0>
- Turowski, V.R., Busi, M.V., Gomez-Casati, D.F., 2012. Structural and Functional Studies of the Mitochondrial Cysteine Desulfurase from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* 5, 1001–1010. <https://doi.org/10.1093/mp/sss037>
- Ukuwela, A.A., Bush, A.I., Wedd, A.G., Xiao, Z., 2018. Glutaredoxins employ parallel monothiol–dithiol mechanisms to catalyze thiol–disulfide exchanges with protein disulfides. *Chem. Sci.* 9, 1173–1183. <https://doi.org/10.1039/C7SC04416J>
- Uzarska, M.A., Dutkiewicz, R., Freibert, S.-A., Lill, R., Mühlhoff, U., 2013. The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. *MBoC* 24, 1830–1841. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-09-0644>
- Uzarska, M.A., Nasta, V., Weiler, B.D., Spantgar, F., Ciofi-Baffoni, S., Saviello, M.R., Gonnelli, L., Mühlhoff, U., Banci, L., Lill, R., 2016. Mitochondrial Bol1 and Bol3 function as assembly factors for specific iron-sulfur proteins. *eLife* 5, e16673. <https://doi.org/10.7554/eLife.16673>
- Uzarska, M.A., Przybyla-Toscano, J., Spantgar, F., Zannini, F., Lill, R., Mühlhoff, U., Rouhier, N., 2018. Conserved functions of *Arabidopsis* mitochondrial late-acting maturation factors in the trafficking of iron-sulfur clusters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1865, 1250–1259. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.06.003>
- Vanin, A.F., 2016. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a “working form” of endogenous nitric oxide. *Nitric Oxide* 54, 15–29. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.01.006>
- Vargas, J., Gómez, I., Vidal, E.A., Lee, C.P., Millar, A.H., Jordana, X., Roschztardt, H., 2023. Growth Developmental Defects of Mitochondrial Iron Transporter 1 and 2 Mutants in *Arabidopsis* in Iron Sufficient Conditions. *Plants* 12, 1176. <https://doi.org/10.3390/plants12051176>
- Vercesi, A.E., Borecký, J., Maia, I. de G., Arruda, P., Cuccovia, I.M., Chaimovich, H., 2006. Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 383–404. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105335>
- Voith von Voithenberg, L., Park, J., Stübe, R., Lux, C., Lee, Y., Philippar, K., 2019. A Novel Prokaryote-Type ECF/ABC Transporter Module in Chloroplast Metal Homeostasis. *Front. Plant Sci.* 10, 1264. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01264>
- Warui, D.M., Sil, D., Lee, K.-H., Neti, S.S., Esakova, O.A., Knox, H.L., Krebs, C., Booker, S.J., 2022. In Vitro Demonstration of Human Lipoyl Synthase Catalytic Activity in the Presence of NFU1. *ACS Bio Med Chem Au* 2, 456–468. <https://doi.org/10.1021/acsbiochemau.2c00020>
- Wei, B., Willems, P., Huang, J., Tian, C., Yang, J., Messens, J., Van Breusegem, F., 2020. Identification of Sulfenylated Cysteines in *Arabidopsis thaliana* Proteins Using a Disulfide-Linked Peptide Reporter. *Front. Plant Sci.* 11, 777. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00777>
- Weiler, B.D., Brück, M.-C., Kothe, I., Bill, E., Lill, R., Mühlhoff, U., 2020. Mitochondrial [4Fe-4S] protein assembly involves reductive [2Fe-2S] cluster fusion on ISCA1–ISCA2 by electron flow from ferredoxin FDX2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 20555–20565. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003982117>

- Willems, P., Wanschers, B.F.J., Esseling, J., Szklarczyk, R., Kudla, U., Duarte, I., Forkink, M., Nooteboom, M., Swarts, H., Gloerich, J., Nijtmans, L., Koopman, W., Huynen, M.A., 2013. BOLA1 Is an Aerobic Protein That Prevents Mitochondrial Morphology Changes Induced by Glutathione Depletion. *Antioxidants & Redox Signaling* 18, 129–138. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4253>
- Woo, H.A., Jeong, W., Chang, T.-S., Park, K.J., Park, S.J., Yang, J.S., Rhee, S.G., 2005. Reduction of Cysteine Sulfinic Acid by Sulfiredoxin Is Specific to 2-Cys Peroxiredoxins. *Journal of Biological Chemistry* 280, 3125–3128. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400496200>
- Wu, H., Xing, K., Lou, M.F., 2010. Glutaredoxin 2 prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell apoptosis by protecting complex I activity in the mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1797, 1705–1715. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.06.003>
- Xu, X.M., Lin, H., Latijnhouwers, M., Møller, S.G., 2009. Dual Localized AtHscB Involved in Iron Sulfur Protein Biogenesis in Arabidopsis. *PLoS ONE* 4, e7662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007662>
- Yang, T.J.W., Lin, W.-D., Schmidt, W., 2010. Transcriptional Profiling of the Arabidopsis Iron Deficiency Response Reveals Conserved Transition Metal Homeostasis Networks. *Plant Physiol.* 152, 2130–2141. <https://doi.org/10.1104/pp.109.152728>
- Yeung, N., Gold, B., Liu, N.L., Prathapam, R., Sterling, H.J., Willams, E.R., Butland, G., 2011. The *E. coli* Monothiol Glutaredoxin GrxD Forms Homodimeric and Heterodimeric FeS Cluster Containing Complexes. *Biochemistry* 50, 8957–8969. <https://doi.org/10.1021/bi2008883>
- Yoo, K.S., Ok, S.H., Jeong, B.-C., Jung, K.W., Cui, M.H., Hyoung, S., Lee, M.-R., Song, H.K., Shin, J.S., 2011. Single Cystathionine  $\beta$ -Synthase Domain-Containing Proteins Modulate Development by Regulating the Thioredoxin System in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 23, 3577–3594. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.089847>
- Yoshida, K., Hisabori, T., 2014. Mitochondrial isocitrate dehydrogenase is inactivated upon oxidation and reactivated by thioredoxin-dependent reduction in Arabidopsis. *Front. Environ. Sci.* 2. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00038>
- Yoshida, K., Noguchi, K., Motohashi, K., Hisabori, T., 2013. Systematic Exploration of Thioredoxin Target Proteins in Plant Mitochondria. *Plant and Cell Physiology* 54, 875–892. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct037>
- Yruela, I., 2013. Transition metals in plant photosynthesis. *Metallomics* 5, 1090. <https://doi.org/10.1039/c3mt00086a>
- Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Groni, H., Marchand, C.H., Puppo, C., Gontero, B., Cassier-Chauvat, C., Decottignies, P., Lemaire, S.D., 2012a. Glutathionylation in the Photosynthetic Model Organism *Chlamydomonas reinhardtii*: A Proteomic Survey. *Molecular & Cellular Proteomics* 11, M111.014142. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014142>
- Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Marchand, C.H., Couturier, J., Gao, X.-H., Rouhier, N., Trost, P., Lemaire, S.D., 2012b. Glutaredoxin S12: Unique Properties for Redox Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* 16, 17–32. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3933>
- Zaffagnini, M., Michelet, L., Massot, V., Trost, P., Lemaire, S.D., 2008. Biochemical Characterization of Glutaredoxins from *Chlamydomonas reinhardtii* Reveals the Unique Properties of a Chloroplastic CGFS-type Glutaredoxin. *Journal of Biological Chemistry* 283, 8868–8876. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709567200>
- Zancani, M., Peresson, C., Biroccio, A., Federici, G., Urbani, A., Murgia, I., Soave, C., Micali, F., Vianello, A., Macrì, F., 2004. Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria: Plant mitochondrial ferritin. *European Journal of Biochemistry* 271, 3657–3664. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04300.x>

- Zannini, F., Roret, T., Przybyla-Toscano, J., Dhalleine, T., Rouhier, N., Couturier, J., 2018. Mitochondrial *Arabidopsis thaliana* TRXo Isoforms Bind an Iron–Sulfur Cluster and Reduce NFU Proteins In Vitro. *Antioxidants* 7, 142. <https://doi.org/10.3390/antiox7100142>
- Zhang, B., Bandyopadhyay, S., Shakamuri, P., Naik, S.G., Huynh, B.H., Couturier, J., Rouhier, N., Johnson, M.K., 2013. Monothiol Glutaredoxins Can Bind Linear  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]^+$  and  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$  Clusters in Addition to  $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+}$  Clusters: Spectroscopic Characterization and Functional Implications. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 15153–15164. <https://doi.org/10.1021/ja407059n>
- Zhang, Y., Swart, C., Alseekh, S., Scossa, F., Jiang, L., Obata, T., Graf, A., Fernie, A.R., 2018. The Extra-Pathway Interactome of the TCA Cycle: Expected and Unexpected Metabolic Interactions. *Plant Physiol.* 177, 966–979. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01687>
- Zimmermann, J., Oestreicher, J., Hess, S., Herrmann, J.M., Deponte, M., Morgan, B., 2020. One cysteine is enough: A monothiol Grx can functionally replace all cytosolic Trx and dithiol Grx. *Redox Biology* 36, 101598. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101598>
- Zsigmond, L., Tomasskovics, B., Deák, V., Rigó, G., Szabados, L., Bánhegyi, G., Szarka, A., 2011. Enhanced activity of galactono-1,4-lactone dehydrogenase and ascorbate–glutathione cycle in mitochondria from complex III deficient *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 809–815. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.04.013>

## **Résumé :**

Les glutarédoxines sont des protéines retrouvées chez la plupart des organismes vivants et faisant partie de la superfamille des thiorédoxines. Elles interviennent généralement dans la régulation redox *via* la catalyse de réactions de glutathionylation ou de déglutathionylation, ou dans l'homéostasie du fer *via* leur capacité à lier et transférer un centre fer-soufre (Fe-S). La glutarédoxine S15 d'*Arabidopsis thaliana* (GRXS15) joue un rôle central dans la machinerie mitochondriale d'assemblage des centres Fe-S (ISC), à l'interface entre la maturation des protéines à centre [2Fe-2S] et la synthèse des centres [4Fe-4S]. Sa capacité à lier un centre Fe-S est dépendante de l'état redox de son unique cystéine, dont les caractéristiques ont par conséquent été étudiées. Il a notamment été montré que la cystéine de GRXS15 est susceptible de subir différents types d'oxydation réversibles pouvant affecter sa fonction au sein de la machinerie ISC. D'autre part, les glutarédoxines de classe II sont généralement capables de former des hétérodimères liant un centre [2Fe-2S] avec les protéines BOLA. Les expériences réalisées ont permis de montrer que les isoformes mitochondriales, BOLA1 et BOLA4, sont effectivement capables de former un hétérodimère liant un centre Fe-S en interaction avec GRXS15. De plus, les résultats suggèrent que l'hétérocomplexe GRXS15-BOLA4 est capable de transférer son centre [2Fe-2S] afin de permettre la formation d'un centre [4Fe-4S] sur le facteur de maturation tardif NFU4. Par ailleurs, des analyses de complémentation fonctionnelle d'un mutant de levure *grx5*, effectuées avec plusieurs variants ou chimères de la GRXS15 d'*A. thaliana*, n'ont pas permis d'identifier les déterminants moléculaires sous-jacents à l'absence de complémentation fonctionnelle par l'isoforme de peuplier observée précédemment, même si l'importance d'un résidu impliqué dans la fixation du glutathion a été confirmée. Enfin, une expérience de co-immunoprécipitation a permis d'isoler et d'identifier plusieurs partenaires potentiels de GRXS15. Parmi eux, se trouvent des membres de la machinerie ISC, mais également des sous-unités de complexes protéiques dont l'activité est impactée dans des lignées d'*A. thaliana* sous-exprimant GRXS15. Tous ces résultats pourraient suggérer l'existence d'une activité redox, en plus de l'activité de transfert de centre Fe-S.

**Mots-clés :** glutarédoxine, centre Fe-S, BOLA, NFU, redox, mitochondrie, *Arabidopsis*

## **Summary :**

Glutaredoxins are ubiquitous proteins present in most organisms and part of the thioredoxin superfamily. They are generally involved either in redox regulation owing to their ability to catalyze glutathionylation or deglutathionylation reactions, or in iron homeostasis through their ability to bind and transfer an iron-sulfur (Fe-S) cluster. The mitochondrial glutaredoxin S15 from *Arabidopsis thaliana* (AtGRXS15) plays an essential role in the iron-sulfur cluster (ISC) machinery, being at the interface of [2Fe-2S] protein maturation and [4Fe-4S] cluster synthesis. Its ability to bind an Fe-S cluster depends on the redox state of its unique cysteine, the characteristics of which were therefore studied. Noteworthy, it has been shown that GRXS15 can undergo different types of reversible oxidation that could affect its function in the ISC machinery. Additionally, it was shown that monothiol glutaredoxins generally form heterodimeric complexes with BOLA proteins binding a [2Fe-2S] cluster. We have shown that the mitochondrial isoforms, BOLA1 and BOLA4, can form heterodimeric complexes with GRXS15 binding an Fe-S cluster. In addition, functional complementation analyses of a yeast *grx5* mutant with several variants or chimeras of *A. thaliana* GRXS15 failed to identify the molecular determinants underlying the lack of functional complementation by the poplar isoform previously observed, although the importance of a residue involved in glutathione binding was confirmed. Finally, a co-immunoprecipitation experiment allowed to isolate and identify several potential partners of GRXS15 and among them, members of the ISC machinery, but also subunits of protein complexes whose activity is impacted in *A. thaliana* lines under-expressing GRXS15. These results might suggest the existence of a redox activity in addition to a role in the transfer of Fe-S clusters.

**Keywords:** glutaredoxin, Fe-S cluster, BOLA, NFU, redox, mitochondria, *Arabidopsis*